Feinnadelaspirationsbiopsie und Transplantataspirationszytologie zur Untersuchung der immunsuppressiven Wirkungen antilymphozytärer Antikörper (ALG) direkt im Transplantat nach allogenen Hunde-Nierentransplantationen.

Thomas Block

Diss
München
1984

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Professor Dr. Dr. h. c. W. Brendel)

Feinnadelaspirationsbiopsie und Transplantataspirationszytologie zur Untersuchung der immunsuppressiven Wirkungen antilymphozytärer Antikörper (ALG) direkt im Transplantat nach allogenen Hunde-Nierentransplantationen.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt an der Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Block
München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. C. Hammer
Mitberichterstatter: Professor Dr. Dr. W. Brendel
Dekan: Professor Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 1984

Meinen Eltern und meiner Frau

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0028

INHALTSVERZEICHNIS:

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ZIELE DER UNTERSUCHUNGEN	6
3. MATERIAL UND METHODEN	7
3.1 Verwendete Tiere	7
3.2 Nierentransplantationen	7
(a) Vorbereitung der Tiere	7
(b) Anästhesie	8
(c) Entnahme der Spenderniere	8
(d) Transplantationstechnik	9
3.3 ALG-Gewinnung	10
3.4 Postoperative Therapie	11
(a) Infusionen und Medikamente	11
(b) ALG-Applikation	11
3.5 Postoperative Untersuchungen	12
(a) Bestimmungen im Vollblut	12

Seite

(b) Bestimmungen im Serum 13

3.6 Tierexperimentelle Versuchsgruppen und Beobachtungszeiten 13
(a) Analyse der in-situ-Wirkungen des ALG 13
(b) FNAB-Zuverlässigkeit 15
(c) Modifikation der Incrementberechnung 15

3.7 Histologische Untersuchungen 16

3.8 Statistik 17

4. FNAB UND TAC ZUR DIAGNOSTIK VON ABSTOßUNGSREAKTIONEN NACH ALLOGENEN NIERENTRANSPLANTATIONEN 18

4.1 FNAB-Durchführung 18

4.2 Verarbeitung der gewonnenen Proben 19

4.3 Transplantataspirationszytologie (TAC) 19
(a) Parenchymzellen 20
(b) Inflammatorische Zellelemente 21

Seite

(c) Diagnostik der Transplantatinflammation: Berechnung des Increments 25

4.4 Modifikation der Incrementberechnung mittels Coulter Counter 26
(a) Durchführung 27
(b) Tierexperimentelle Versuchsgruppen 28
(c) Orientierende Untersuchungen bei menschlichen Transplantatempfängern zur diagnostischen Aussagekraft 29

5. ERGEBNISSE

5.1 Allogene Hunde-Nierentransplantationen mit (Versuchsgruppe 2) und ohne ALG (Versuchsgruppe 1) 31
(a) Transplantatfunktionszeit 31
(b) Blutuntersuchungen 31
(c) Histologie 33
(d) Fluktuationen einzelner Leukozytenpopulationen 34

Seite

5.2 Analyse der unmittelbaren Wirkungen einer einmaligen ALG-Applikation nach allogenen Hunde-Nierentransplantationen (Versuchsgruppe 3) 40
(a) Zeitpunkt der Ausführung der Untersuchungen 40
(b) Blutparameter 40
(c) Unmittelbare Veränderungen des weißen Blutbildes 41
(d) Unmittelbare Veränderungen einzelner Leukozyten im Transplantat und Increment 43

5.3 Autologe Hunde-Nierentransplantationen mit und ohne ALG (Versuchsgruppen 4 und 5) 47
(a) Blutuntersuchungen 47
(b) Zuverlässigkeit der FNAB-Ergebnisse 49
(c) Unspezifische ALG-Wirkung auf Autotransplantate 51

5.4 Nebenwirkungen der FNAB 53

5.5 Modifikation der Incrementberechnung mittels Coulter Counter 53
(a) Darstellung der Berechnung 54

Seite

(b) Nähere Untersuchung einzelner Leukozytenpopulationen im Transplantat unter ALG-Immunsuppression 56
(c) Nähere Untersuchung zellulärer Veränderungen einzelner Leukozytenpopulationen im Transplantat nach einer einmaligen ALG-Gabe 59
(d) Orientierende Untersuchungen bei menschlichen Allotransplantatempfängern zur diagnostischen Aussagekraft 62

6. DISKUSSION 76

6.1 Allgemeines 76
(a) Verwendete Tiere 76
(b) Transplantatfunktionszeiten 76

Seite

6.2 FNAB-Methode 77
(a) Nebenwirkungen der FNAB 77
(b) Zuverlässigkeit der FNAB 78
(c) FNAB-Increment 80
(d) Modifikation der Incrementberechnung 82

6.3 Wirkungen antilymphozytärer Antikörper im Transplantat und Blut 84
(a) Hypothesen der peripheren ALG-Wirkung 85
(b) ALG induzierte Blutveränderungen nach allogener Hundenierentransplantation 88
(c) ALG-Wirkungen im Transplantat 90

6.4 Histologie 100

7. ZUSAMMENFASSUNG 101

8. LITERATURNACHWEIS 106

9. Anhang 138

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN:

A.	Arteria
aIK	absolutes Inkrement
ALG	Anti-Lymphozyten-Globulin
ATN	akute Tubulusnekrose
Con A	Concanavalin A
DLA	dog-leucocyte-antigen
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
h	Stunde
Hk	Hämatokrit
IF	Inflammationsfaktor
Ik	Inkrement
i.m.	intramuskulär
I.U.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LGL	large granulated lymphocytes
m	Musculus
mg	Milligramm
MGG	May-Grünwald-Giemsa
min	Minute
MLC	gemischte Lymphozytenkultur
p. op.	postoperativ
PHA	Phytohämagglutinin
PWM	Pokeweed Mitogen
RBC	Erythrozyten
rIK	relatives Inkrement
rpm	Umdrehungen pro Minute
TAC	Transplantataspirationszytologie
Tg	Tage
VG	Versuchsgruppe
WBC	Leukozyten
V.	Vena

1. EINLEITUNG:

Antilymphozytenglobulin (ALG) wird sowohl zur Suppression von Abstoßungsreaktionen transplantierter Organe als auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, lymphatischen Leukämien und aplastischen Anämien klinisch eingesetzt (19, 72, 111, 112).

Als gereinigte IgG-Fraktion enthält es den antikörperaktiven Immunglobulinanteil des Antilymphozytenserums (ALS). Durch Immunisierung einer Spezies (Pferd) mit Lymphozyten einer anderen Spezies (Mensch) gewinnt man heterologes Pferd-anti-Mensch-ALG/ALS.

1899 beschrieb Metchnikoff (108) als erster die immunologischen Erscheinungen der Leukagglutination und Leukotoxizität polymorphkerniger Leukozyten in Tieren nach Applikation heterologer Antisera gegen Milz- und Lymphknotenzellen. In den Folgejahren wurde dann durch eine Vielzahl von in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen versucht, den Effekt und die Bedeutung antikörperaktiver, heterologer Antisera näher zu bestimmen.

Die wichtigsten Beiträge stammen von:

1900 Besredka (15)
Direktwirkung auf Lymphozyten durch komplementabhängige Zyototoxizität

1902 Flexner (44)
Direkteinfluß auf Lymphozyten und lymphoides Gewebe infolge Lymphknotenhyperplasie und Lymphozytenzerstörung

1905 Christian (30)
Beeinflussung der Leukozyten durch Inhibition der Leukozytenbeweglichkeit in vitro

1917 Pappenheimer (118)
Direktwirkung auf Lymphozyten infolge speziesspezifischer Toxizität des Antiserums und in-vivo-Zytotoxizität auf Thymuszellen

1937 Chew (29)
direkte Wirkung auf Lymphozyten infolge in-vivo-Lymphopenie

1956 Inderbitzin (78)
Inhibition des zellulären Immunsystems durch Unterdrückung von Hautreaktionen des verspäteten Typs nach Tuberkulin-Applikationen

1960 Walksman (157)
Suppression der zellulär vermittelten Immunreaktion durch Unterdrückung der experimentellen allergischen Enzephalitis und Erhöhung der Überlebenszeit von Hauttransplantaten

1963 Woodruff (167)
Verlängerung der Überlebenszeit von Haut-Allotransplantaten bei in-vivo-Lymphopenie

Nachdem Walksman et al. (157) und Woodruff et al. (167) unter ALG-Behandlung verzögerte Abstoßungsreaktionen von Haut-Allotransplantaten nachweisen konnten, wurde das Antiserum gezielt zur Unterdrükkung von Immunreaktionen in der Organtransplantation eingesetzt. In Tierexperimenten konnte durch antilymphozytäre Antikörper bei verschiedenen Applikations- und Therapieweisen eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit allogener Organtransplantate erreicht werden (1, 43, 68, 123, 143). Diese verzögerten Abstoßungsreaktionen scheinen auf der Suppression der primären (110, 112), und nicht der sekundären (83) Immunantwort zu beruhen.

In der klinischen Anwendung hingegen ist der therapeutische Effekt antilymphozytärer Antikörper zur

Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Nieren-, Herz-, Leber-, Pankreas- und Knochenmarkstransplantationen heftig umstritten (50). Während eine Reihe von Studien hochsignifikante Verbesserungen der Transplantationsergebnisse unter ALG-Behandlung nachweisen (34, 76, 101, 147, u.a.) und Halloran et al. sogar dafür plädieren, ALG infolge seiner geringeren Nebenwirkungen dem Cyclosporin A vorzuziehen (57), waren andere Untersuchungen demgegenüber außerstande, eine ausreichende immunsuppressive Wirkung des ALG festzustellen (17, 33, 40, 51, u.a.). Sheil et al. berichten nach Prüfung der klinischen Wirksamkeit antilymphozytärer Antikörper über sich widersprechende Ergebnisse (137, 138, 139, 140).

Diese Kontroversen basieren im wesentlichen auf der fehlenden Kenntnis über die Wirkungen antilymphozytärer Antikörper direkt im Transplantat (148).

Die von Pasternack erstmals 1968 und 1973 in der Literatur erwähnte (120, 121) und von Häyry (62) und von v. Willebrand (159) weiterentwickelte Methode der Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) und Transplantataspirationszytologie (TAC) humaner Nierentransplantate ermöglicht es nun, die in-situ-inflammatorischen Zellelemente direkt zu bestimmen, ihre Fluktuationen zwischen Transplantat und Peripherie zu beobachten sowie den Beginn, das Ausmaß und den Verlauf von Abstoßungsreaktionen zu diagnostizieren bzw. zu verfolgen.

Als zytologische und nicht histologische Untersuchungsmethode wird die FNAB bereits seit Jahrzehnten mit Erfolg zur Erkennung von Schilddrüsen- (79, 135), Knochenmarks- (23, 135) und Prostataerkrankungen (47, 99) in der Klinik eingesetzt.

Ihre Applikation in der Nieren-Transplantationschirurgie besitzt wesentliche Vorteile gegenüber der zur Bestimmung von Abstoßungsreaktionen gebräuchlichen histologischen Methode der Stanzbiopsie (173). Dies deshalb, weil bei der Ausführung der Stanzbiopsie die Komplikationsrate höher (Tab. 1) und die Indikationsstellung enger (Tab. 2) ist als bei der - zwar auch invasiven, aber schonenderen - FNAB.

Komplikation	Inzidenz (%)
1. Makrohämaturie	3,40
2. perirenales Hämatom	0,56
3. Oligurie/Anurie	0,08
4. Schock	0,11

Tab. 1: Komplikationen der Stanzbiopsie in 15135 Fällen (173).

Indikationsstellungen der Stanzbiopsie
1. Postoperative Anurie mehr als 2 Wochen
2. Progredienz von Abstoßungsreaktionen trotz Erhöhung der immunsuppressiven Therapie
3. Langsame Verschlechterung der Transplantatfunktion
4. Verstärkung der Proteinurie und/oder Hämaturie
5. Kontrolluntersuchung nach Transplantation (anfangs in halbjährlichen bis jährlichen Abständen,später in Mehrjahres-Intervallen)

Tab. 2: Indikationsstellung der Stanzbiopsie zur Überwachung nierentransplantierter Patienten (173).

Weitere Vorzüge der FNAB sind:

1. die Diagnosestellung eines Stadiums einer zellulären Abstoßungsreaktion innerhalb von zwei Stunden nach Punktion (61, 67),
2. die in kurzen Abständen zu wiederholenden Untersuchungen ohne Schaden für den Patienten (61, 67),
3. die Möglichkeit der Serienbiopsien zur in-situ-Therapiekontrolle einer immunsuppressiven Behandlung (61, 67),
4. die Vermeidung einer durch Immunsuppressiva induzierten zusätzlichen Schwächung des Patienten, wenn durch das zytologische Bild eine akute Tubulusnekrose (ATN) bei fehlender Transplantatfunktion von einer Immunreaktion unterschieden werden kann (61, 67),
5. die Untersuchung von in-situ-Effektormechanismen der Transplantatabstoßung (64, 161, 162),
6. die Überprüfung der Wirkung neuer immunsuppressiver Therapiemöglichkeiten im Experiment und Klinik,
7. die Möglichkeit, weitere in-vitro-Tests mit direkt aus dem Transplantat stammenden inflammatorischen Zellen durchzuführen.

Trotz dieser Vorteile muß betont werden, daß die Methode der FNAB weder die Stanzbiopsie noch andere Diagnostika zur Überwachung nierentransplantierter Patienten ersetzen kann und soll (61).

In den dargestellten Untersuchungen wird zum ersten Mal im Tierexperiment versucht, den Einfluß und die Wirksamkeit antilymphozytärer Antikörper direkt im Transplantat kontinuierlich mittels FNAB und TAC zu verfolgen. Dieses Vorgehen führt somit auch zu einer besseren Einschätzung der unmittelbaren in-situ-Wirkungen des ALG.

2. ZIELE DER UNTERSUCHUNGEN:

Diese Arbeit zielte auf:

(1) die Erfassung des zeitlichen Auftretens einzelner Leukozytenpopulationen im Transplantat und die Korrelation ihres in-situ-Erscheinens mit Abstoßungsreaktionen bei
   (a) Tieren unter immunsuppressiver Therapie mit Pferd-anti-Hund-Lymphozytenglobulin (ALG),
   (b) Tieren ohne Immunsuppression,

(2) die Überprüfung der Zuverlässigkeit der FNAB,

(3) die Bestimmung von Nebenwirkungen der FNAB,

(4) die Verbesserung der FNAB-Auswertung mit Hilfe eines Coulter Counters, womit
   (a) eine höhere Sensitivität der Methode erreicht und damit
   (b) die Diagnostik von Abstoßungsreaktionen erleichtert werden soll.

3. MATERIAL UND METHODEN:

3.1 Verwendete Tiere:

Es wurden 19 allogene und 4 autologe Hunde-Nierentransplantationen durchgeführt.

Als Empfänger- und Spendertiere dienten 23 Bastardhunde beiderlei Geschlechts mit Körpergewichten von 19,4 ± 2,9 kg.

Die Tiere wurden in Einzelboxen gehalten. Einmal täglich erhielten sie für mehrere Stunden Auslauf. Ernährt wurden die Tiere mit Hundefertigfutter[1)], teilweise mit Nudeln gemischt. Wasser wurde ad libidum geboten.

3.2 Nierentransplantationen:

(a) Vorbereitung der Tiere:

Nierenspender und Nierenempfänger wurden 2 Wochen vor Versuchsbeginn aktiv gegen Staupe[2)] immunisiert und antihelminthisch[3)] behandelt. Die Nierentransplantationen wurden nur nach Ausschluß einer präoperativen Leukozytose durchgeführt.

1) PAL^{R}-Hundefertigfutter, Effem GmbH, Verden
2) Candur^{R} SHL, Behringwerke AG, Marburg
3) Telmin^{R}, Jansen-Pharmazeutika, Bad Homburg

(b) Anästhesie:

Nierenspender und -empfänger erhielten als Prämedikation Atropin[1] (0,5 mg i.m.), das Neuroleptikum N-(3'-dimethyl-aminophenyl)-3-propionyl-phenothiazin-phosphat[2] (4,3 mg/kg KG) und das Morphinderivat Levomethadonhydrochlorid [3] (1 mg/kg KG).

Nach endotrachealer Intubation wurde die Narkose mit 3 Vol. % Halothan[4], 50% Stickoxydul und 50% Sauerstoff bei einem Atemminutenvolumen von etwa 5 l/min und einer Atemfrequenz von 14/min eingeleitet; die Einstellungen des Atemminutenvolumens und der Atemfrequenz richteten sich nach dem jeweiligen Körpergewicht der Tiere. Zur Aufrechterhaltung der Narkose reichte gewöhnlich 0,6 - 0,8 Vol. % Halothan[4].

(c) Entnahme der Spenderniere:

Von einem Medianschnitt aus erfolgte nach Präparation der Niere die Darstellung und Mobilisation der A. und V. renalis. Es schloß sich die Freipräparation des Ureters bis zur Harnblase sowie dessen Unterbindung mit Durchtrennung an. Nach Abklemmen der A. renalis proximal zur Aorta abdominalis und der V. renalis - bei Entnahme der linken Niere am Abgang der V. testicularis bzw. V. ovarica oder bei rechtsseitiger Nephrektomie proximal zur V. cava inferior - wurden die Vasa renales durchtrennt.

Die Spenderniere wurde 7 - 10 Minuten mit 500 ml

1) Atropinsulfat ^{R}, Drobena GmbH, Berlin
2) Combelen^{R}, Bayer AG, Leverkusen
3) 1-Polamivet^{R}, Hoechst AG, Frankfurt/M.
4) Halothan^{R}, Hoechst AG, Frankfurt/M.

einer Perfusionslösung (4°C Elektrolytgemisch[1]) mit 5.000 I.U. Heparin[2]) blutleer gespült. Während der kalten Ischämiezeit wurde das Transplantat in einem Gefäß mit Perfusionslösung auf Eiswürfeln bei 4°C gelagert.

(d) Transplantationstechnik:

Die unilaterale, heterotope, intraperitoneale Nierentransplantation begann mit einem medianen Hautschnitt, Durchtrennung der Linea alba m. recti und Eröffnung des Peritoneums. Nach Darstellung und Mobilisierung der Vasa iliaca wurden die V. renalis End-zu-Seit an die V. iliaca externa und die A. renalis End-zu-End an die A. iliaca externa anastomosiert. Um das Ausmaß einer akuten Tubulusnekrose infolge der warmen Ischämie gering zu halten, wurde die Spenderniere während der Anastomosierung mit einer auf 4°C temperierten NaCl-Lösung[3]) gekühlt.

Die Implantation des Ureters in die Blase erfolgte bei einem Teil der Tiere über eine bilaterale Blasenwanderöffnung, Durchführung des Ureters durch die obere Inzision und nach Schlitzung des Harnleiters mit Ureternaht an die Blasenmucosa. Der andere Teil der Tiere erhielt eine Blasen-Antirefluxplastik nach Lich-Grégoir (100): Nach Vernähung der Uretermucosa auf die freipräparierte Blasenmucosa wurde der Ureter in eine völlig von Detrusormuskulatur freie Rinne direkt von außen auf die Blasenschleimhaut gelegt. Für die Gefäßanastomosen und Ureternähte wurden

1) Tutofusin^{R}, Fresenius KG, Bad Homburg
2) Heparin-novo^{R}, Novo-Industrie GmbH, Mainz
3) Isotonische Kochsalzlösung^{R}, Fresenius KG, Bad Homburg

Prolene 6-0[1)]-Fäden verwendet. Die über dem Ureter zu liegen kommende Blasenmuskulatur wurde durch Einzelknopfnähte mit Catgut 3-0[1)] verschlossen.

Nach Nephrektomie der beiden eigenen Nieren des Empfängers wurde der Transplantat-Gefäßverlauf überprüft, die transplantierte Niere zur Verhinderung eines Abknickens oder Abdrehens pexiert, und das Abdomen dann schichtweise mit Vicryl 3-0[1)]-Fäden verschlossen.

Perioperativ erhielten die Tiere eine Elektrolytinfusion (150 ml/h) mit Gentamycin[2)] (40 mg), unmittelbar nach Anastomosenfertigstellung Furosemid[3)] (20 mg i.v.) und vor Abdomenverschluß Gentamycin (40 mg intraperitoneal). Zur Ileus- und Invaginationsprophylaxe wurden nach Transplantationsende Dextran[4)] (20 g) mit Sorbit[4)] (40 g) infundiert.

3.3 ALG-Gewinnung:

Die Gewinnung des ALG erfolgte nach der Methode von Pichlmayr (123). Das verwendete Pferd-anti-Hund-Lymphozytenglobulin hatte einen Lymphozytotoxizitätstiter von 1:256 und einen Hämagglutinationstiter von 1:8. Der Antikörpergehalt des ALG wurde im Lymphozytotoxizitätstest bestimmt (123).

1) Ethicon GmbH, Hamburg,
2) Sulmycin^{R}, Byh-Essex GmbH, München
3) Lasix^{R}, Hoechst AG, Frankfurt/M
4) Rheomacrodex^{R} 10% mit Sorbit 20%, Knoll AG, Ludwigshafen

3.4 Postoperative Therapie:

(a) Infusionen und Medikamente:

In den ersten drei postoperativen Tagen erhielten die Empfängertiere 500 ml Elektrolytlösung. Danach wurde nur noch dann Flüssigkeit substituiert, wenn der Hämatokrit über 40 % lag.

Während der ersten drei p. op. Tage wurde Gentamycin (40 mg i.m.), Ampicillin[1)] (3 g i.v.) und Oxacillin[1)] (2 g i.v.) appliziert. Diese antibiotische Therapie wurde bei p. op. Leukozytose fortgeführt bzw. wiederaufgenommen (46). Zur Analgesie erhielten die Tiere in den ersten beiden postoperativen Tagen Metamizol-Natrium[2)] (1000 mg. i.m).

(b) ALG-Applikation:

ALG wurde täglich in einer Dosierung von 20 mg/kg KG appliziert. Bis zum 4. p. op. Tag wurde das Antiserum mit den Elektrolyten infundiert. In der Folgezeit wurde ALG nach Verdünnung in einer 250 ml Elektrolytlösung verabreicht. Um die Verträglichkeit des ALG zu verbessern und Emesis zu mindern, erhielten die Tiere vor der ALG-Gabe 5 mg Metoclopramid[3)] i.v.

1) Totocillin^{R}, Bayer AG, Leverkusen
2) Novalgin^{R}, Hoechst AG, Frankfurt/M.
3) Paspertin^{R}, Kali-Chemie GmbH, Hannover

3.5 Postoperative Untersuchungen:

(a) Bestimmungen im Vollblut:

1. Harnstoff:
10 µl Vollblut wurden auf einen Harnstoff-Teststreifen[1)] zur Bestimmung aufgebracht und der entsprechende Retentionswert nach 30 Minuten abgelesen. Diese Untersuchung diente der täglichen groben Orientierung über die Transplantatfunktion.

2. Hämoglobin, Erythrozyten, Leukozyten:
Die Bestimmung dieser drei Parameter erfolgte täglich mit dem Haemo-Analyzer[2)].

3. Hämatokrit:
Blutgefüllte heparinisierte Kapillarröhrchen wurden täglich mit der Mikrozentrifuge[3)] 5 min. bei 5000 rpm zentrifugiert, und der Hämatokrit mit einer Schablone bestimmt.

4. Blutausstrich:
Der auf einen Objektträger dünn ausgestrichene Bluttropfen wurde nach Lufttrocknung nach May-Grünwald-Giemsa (107) gefärbt. Der prozentuale Anteil einzelner Leukozytenpopulationen wurde bei 1000facher Vergrößerung und Auszählung von jeweils 200 Zellen mit anschließender Mittelwertbildung bestimmt.

1) Merckognost^{R} Harnstoff, Merck, Darmstadt
2) Haemo-Analyzer^{R}, Clay-Adams-Laboratories, Canada
3) Hämatokrit-Zentrifuge^{R}, Hettich GmbH, Tuttlingen

(b) Bestimmungen im Serum:

1. Renale Retentionsparameter:
Die Bestimmungen des Harnstoffs und Kreatinins erfolgten nach Anleitung der "biochemischen Testkombination"[1].

2. Elektrolyte:
Die Molarität von Natrium- und Kaliumionen wurde flammenphotometrisch[2] bestimmt.

3.6 Tierexperimentelle Versuchsgruppen und Beobachtungszeiten:

Die Einschätzung des Beginns und Verlaufs von Abstoßungsreaktionen erfolgte bei 19 allogenen und 4 autologen Hunde-Nierentransplantationen durch die tägliche Anwendung der FNAB. Die Methode der FNAB und die Diagnostik von Abstoßungsreaktionen mittels TAC werden eingehend im Kapitel 4 beschrieben.

Die Tiere verteilten sich auf die nachstehend dargestellten Versuchsgruppen 1 bis 6: Die in-situ-Wirkungen des ALG wurden an Tieren der Gruppen 1 bis 4 untersucht. Die methodische Zuverlässigkeit der FNAB wurde an Tieren der Versuchsgruppen 4 und 5 geprüft. Die Modifikation der Incrementberechnung erfolgte an Versuchstieren der Gruppe 6.

(a) Analyse der in-situ-Wirkungen des ALG:
Gruppe 1 (n=5) bestand aus Tieren, die nach Allo-

1) Biochemische Testkombinationen, Boehringer GmbH, Mannheim
2) Eppendorf Photometer, Eppendorf GmbH, Hamburg

transplantation nicht immunsuppressiv behandelt wurden.

Gruppe 2 (n=7) umfaßte die mit ALG immunsupprimierten Tiere nach allogener Nierentransplantation.

Die Versuche der Gruppen 1 und 2 wurden zu dem Zeitpunkt beendet, an dem der Serumharnstoff Werte von 350 mg/100ml erreicht hatte ("Transplantatfunktionszeit"). Bei diesem renalen Retentionswert befanden sich die Nierentransplantate noch in einem Zustand, der weitere in-vitro-Untersuchungen zuließ (158). Zur Bestimmung der Wirkung des ALG auf einzelne Lymphozytensubpopulationen in Allotransplantaten, die ausgeprägte Abstoßungsreaktionen zeigten, wurde nach steriler Transplantatentnahme ein lymphozytenreiches Eluat gewonnen (158). Diese separierten Zellen wurden mit den Mitogenen Concanavalin A (Con A), Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed Mitogen (PWM) sowie in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) mit spenderspezifischen Lymphozyten stimuliert. ConA und PHA regen besonders die T-Lymphozyten zur Transformation an, PWM stimuliert sowohl T- als auch B-Lymphozyten. In der MLC korreliert der Grad der Histoinkompatibilität entfernt mit dem Ausmaß der Bildung transformierter Lymphozyten.

Gruppe 3 (n=5) bestand aus Tieren nach allogenen Nierentransplantationen mit p. op. ALG-Immunsuppression. An ihnen wurden zur Analyse der unmittelbaren Wirkung antilymphozytärer Antikörper nach einer einmaligen ALG-Applikation in kurzen Intervallen Incrementbestimmungen durchgeführt. Als Zeitpunkt dieser Intervallbiopsien wurde der Tag gewählt, an dem die FNAB-Ergebnisse der Versuchsgruppe 2 ausgeprägte in-situ-Inflammationen auswiesen.

Gruppe 4 (n=2) bestand aus den mit ALG behandelten Tieren nach autologer Nierentransplantation. Durch den Ausschluß einer allogenen immunologischen Konstellation sollten mögliche unspezifische Wirkungen des ALG beobachtet werden.
Die Transplantate dieser Tiere wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich feinnadelbiopsiert.

(b) FNAB-Zuverlässigkeit:
Gruppe 4 (n=2) umfaßte Tiere, die nach Autotransplantationen ALG erhielten.
Gruppe 5 (n=2) setzte sich aus Tieren zusammen, die nach autologer Nierentransplantation nicht immunsuppressiv behandelt wurden.
Dieser Versuchsaufbau zielte auf den Ausschluß einer Abstoßungsreaktion. Es sollte festgestellt werden, ob die TAC in diesen Transplantaten auch tatsächlich keine inflammatorischen Reaktionen zeigte. Es wurde also die Zuverlässigkeit in der diagnostischen Erkennung von Abstoßungsreaktionen geprüft.
Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden 14 Tage beobachtet.

(c) Modifikation der Incrementberechnung:

Untersuchungen zur Bewertung der diagnostischen Aussagefähigkeit einer methodischen Modifikation der Incrementberechnung, die auf eine Erhöhung der Sensitivität in der Diagnostik von Abstoßungsreaktionen zielte, erfolgten an 14 Biopsien von 2 Hunden der Versuchsgruppe 3 bis zu den Tagen der Ausführung der

Intervallbiopsien.
Gruppe 6 (n=2) umfaßte demgemäß Tiere mit ALG immunsupprimierten Allotransplantaten.

3.7 Histologische Untersuchungen:

Nach dem Tod der Versuchstiere wurden renale Gewebeschnitte in 4% Formalinlösung fixiert. Die Präparate wurden in 3 bis 5 µm dicke Scheibchen geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und mit Hämalaun gefärbt.

Die Auswertung der histologischen Befunde erfolgte nach einem semiquantitativen Schlüssel (Tab. 3) (126).

Gewebsbestandteile		Veränderung
NIERE	Gefäße	Thromben
	Arterien	intravasale Zellvermehrung
	Arteriolen	Endothelkontakt
	Kapillaren	Endothelnekrose, -proliferation
	Venen	Medianekrose, -infiltration
	Intersititium	Zellinfiltrate
		Ödem
		Blutung
		Granulationsgewebe
		Fibrose, Narbenbildung
	Tubuli	Nekrose
		Atrophie
		Zylinder
		hyalintropf. Speicherung
		Nephrohydrose
		Papillennekrose
	Glomeruli	Narben, Synechien
		intravasale Zellvermehrung
		Thromben
		Endothelnekrose, -proliferation
		Mesangiumverbreit., Mesangiolyse
		Basalmembr.-Verdickung, -Schlängelung, -Doppelkontur, -Aneurysmabildung
		Epithelproliferation, Speicherung

Tab. 3: Schlüssel der semiquantitativen Auswertung histologischer Befunde in Nierentransplantaten (123).

3.8 Statistik:

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Versuchsgruppen 1, 2, 4 und 5 wurden mit dem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben, die der Versuchsgruppen 3 und 6 mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ausgewertet (142).

4. FNAB UND TAC ZUR DIAGNOSTIK VON ABSTOßUNGSREAKTIONEN NACH ALLOGENEN NIERENTRANSPLANTATIONEN:

4.1 FNAB-Durchführung:

Bei den nierentransplantierten Hunden wurden die in-situ-Inflammationen mit Hilfe der FNAB und TAC in täglichen Abständen bestimmt und bewertet (61, 159).

Nach Ultrakurz-Anästhesie mit Methohexital-Natrium[1] (70-120 mg i.v.), Palpation des Transplantats und Desinfektion des Punktionsgebiets wurde die Biopsienadel perkutan in das Organ eingeführt. Es handelte sich bei der Biopsienadel um eine Spinalnadel für Kinder[2] mit einem äußeren Durchmesser von 0,6 mm, in der ein Mandrin lag. Als Anhaltspunkt für die exakte Nadellokalisation im Transplantat diente die leichte, pulssynchrone Vibration der Nadel. Der in der Nadel liegende Mandrin, der die Punktion erleichtert und eine vorzeitige Aspiration transplantatfremder Zellen verhindert, wurde gezogen. Die Nadel wurde mit einer Spritze, die Hank-Lösung (4 ml) mit Heparin (50 IU/ml) enthielt, verbunden. Die Spritze selbst wurde von einem Aluminium-Handgriff[3],

1) Brevimytal^{R}-Natrium, Lilly GmbH, Bad Homburg
2) BD Spinal Needle 22 G 3 1/2, B-D Luer-Lok, Trademarks of Becton, Dickinson & Company, Rutherford, U.S.A.
3) Cameco^{R}-Handgriff, Empfenzeder, München

der eine gute Aspiration ermöglicht, gehalten. Zur Lösung der Nierenzellen aus dem Transplantatparenchym wurde die Nadel unter leichtem Aspirationszug etwa 5 mm hin und her bewegt und schließlich wieder aus dem Transplantat entfernt. Zur Incrementberechnung - in 4.3 (c) eingehend beschrieben - wurde noch heparinisiertes Venenblut abgenommen und mit Hank-Lösung 1:500 verdünnt. Durch diese Berechnung kann man auf die tatsächlich im Transplantatparenchym ansässigen inflammatorischen Zellen schließen und das Ausmaß einer Abstoßungsreaktion bestimmen.

4.2 Verarbeitung der gewonnenen Proben:

Biopsieaspirat und verdünntes Blut wurden 4 bis 5 min. bei 500 rpm auf Objektträger zytozentrifugiert[1)] und der so entstandende Zellsatz nach May-Grünwald-Giemsa (107) gefärbt. Die prozentualen Häufigkeiten einzelner Leukozytenpopulationen im Aspirat und Blut wurden bei 1000facher Vergrößerung mit dreimaliger Zählung und anschließender Mittelwertbildung bestimmt. Zur Beurteilung der Gültigkeit der FNAB wurde im Aspirat zusätzlich noch die Zahl der auf 100 Leukozyten erscheinenden Parenchymzellen festgestellt. Aus der jeweiligen Differenzbildung der prozentualen Häufigkeiten einzelner Leukozytenpopulationen des Biopsieaspirats und der Blutprobe resultiert das sogenannte Increment, ein Maß für die mononukleäre in-situ-Inflammation (58, 60, 61, 159, 160).

4.3 Transplantat-Aspirations-Zytologie (TAC):

Die TAC erlaubt die Identifikation der im Transplan-

1) Shandon Scientific Co., London N. W. 10, England

tat existenten Zellen, also Leukozyten und Parenchymzellen.

(a) Parenchymzellen:

Das Auftreten von Parenchymzellen beweist die exakte Nadellokalisation im Transplantat. Die FNAB ist dann repräsentativ, wenn sie, bezogen auf 100 Leukozyten, 10 bis 30 Parenchymzellen enthält (61). Die folgenden parenchymalen Zellelemente sind zu unterscheiden (61, 159):

1. Endothelzellen sind rund-ovale Zellen mit einem Durchmesser von etwa 20 µm. Infolge ihrer hohen Fragilität erscheinen sie im Biopsieaspirat oft deformiert. Sie stammen vom Nierengefäßsystem, insbesondere von den renalen Kapillaren. Das Zytoplasma fehlt oft oder ist bei Vorhandensein blaß und strukturlos. Manchmal zeigt es aber auch eine Vakuolenbildung. Der Nukleus erscheint oval, blaß mit locker und feingranuliert ausgebildetem Chromatin. Gewöhnlich beinhaltet er scharf abgegrenzte, bläuliche Nukleolen.

2. Proximale Tubuluszellen haben einen Durchmesser von 10 bis 15 µm. Das basophile Zytoplasma ist häufig perinukleär granuliert. Der exzentrisch liegende rund-ovale Nukleus färbt sich dunkel an und weist gewöhnlich ein bis zwei Nukleolen aus.

3. Zellen der Henle-Schleife sind große, nicht granulierte Parenchymzellen mit einem Durchmesser von 20 bis 25 µm und blassem, strukturlosem Zytoplasma. Im gering exzentrisch liegenden, runden Nukleus findet sich gewöhnlich

ein sichtbarer Nukleolus mit feingranuliert angeordnetem Chromatin.

4. Distale Tubuluszellen haben etwa denselben Durchmesser wie die Zellen der Henle-Schleife, jedoch ist ihr Zytoplasma grau-blau, opaque und beinhaltet kleine, blaue Granulationen. Der elliptische Nukleus ist nicht strukturiert.

5. Glomeruläre Zellen besitzen einen Durchmesser von 5 bis 12 µm. Der scharfabgegrenzte, runde Nukleus nimmt fast den gesamten Zelldurchmesser ein, so daß diese Zellen nur einen schmalen, blaß-grauen Zytoplasmarand ausweisen.

(b) Inflammatorische Zellelemente:

Immunkompetente Zellen, die während einer Abstoßungsreaktion im Transplantat erscheinen, sind:

1. Lymphoblasten als sensibilisierte lymphatische Blastenformen (70), die T-Lymphozyten repräsentieren (160, 161). Diese Lymphoblasten haben einen Durchmesser von 12 bis 25 µm (58, 105, 155, 159). Das basophile Zytoplasma ist verschieden breit und weist eine perinukleäre Aufhellungszone aus (70). Im grobnetzigen Chromatin des Nukleus finden sich als wesentliche Charakteristika ein bis zwei Nukleoli (61, 155).

2. Plasmablasten und Plasmazellen als sensibilisierte Formen der B-Lymphozyten (155, 160) in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung. Da die definitive Determination der einzelnen Entwick-

lungsstufen vom Plasmablasten über den Proplasmozyten zur Plasmazelle nur schwer möglich und ungenau ist, wurden diese Zellen in ihrer prozentualen Auszählung als "Plasmablasten und Plasmazellen" zusammengefaßt (61). Die Plasmablasten haben einen Durchmesser von 16 bis 22 µm (61, 155, 159). Im Vergleich zu den Lymphoblasten zeigen die Plasmablasten ein basophileres Zytoplasma mit Vakuolen und perinukleärer Aufhellung. Der exzentrisch liegende runde, mit dichtem Chromatin ausgefüllte Nukleus zeigt als weiteres Charakteristikum mehrere prominente Nukleoli (155). Proplasmozyten sind mit einem Durchmesser von bis zu 25 µm (61, 155, 159) größer. Die Nukleolen erscheinen auf dieser Entwicklungsstufe in Aussehen und Zahl deutlicher. Das Zytoplasma färbt sich tiefer basophil mit einer leichten Rot-Komponente an (155) und weist eine perinukleäre Aufhellungszone sowie Vakuolen auf. Durch die Immunfluoreszenz-Technik konnte gezeigt werden, daß diese Vakuolen intrazelluläres Immunglobulin beinhalten (61). Plasmazellen hingegen sind mit einem Durchmesser von 12 bis 20 µm (61, 155, 159) kleiner als ihre Vorstufen. Als Charakteristika gelten die elongierte Zellform und der exzentrisch liegende Nukleolus. Durch Chromatinakkumulation mit den entsprechend angrenzenden schmalen, hellen Feldern entsteht der Eindruck einer "Radspeichenstruktur" (61, 70), die jedoch nur selten lichtmikroskopisch zu erkennen ist. Als weiteres Charakteristikum weisen auch die Plasmazellen intrazytoplasmatische Vakuolen aus.

3. Große und kleine Lymphozyten, die sich teilweise in verschiedenen Differenzierungsgraden zu T- oder B-Zellen darstellen können. Die kleinen Lymphozyten haben einen Durchmesser von 6 bis 12 µm (61, 105, 155, 159). Um den Zellkern herum findet man einen schmalen, hellblauen Zytoplasmasaum. Der Nukleus selbst weist ein dunkelviolettes, verklumptes Chromatin aus. Der Durchmesser des großen Lymphozyten variiert von 9 bis 16 µm (61, 105, 155, 159). Im Gegensatz zu den kleinen Lymphozyten erkennt man beim großen Lymphozyten eine Zunahme der Zytoplasma-Kern-Relation. Der runde oder leicht eingebuchtete Nukleus weist ein intensives, teilweise zum Verklumpen neigendes Chromatin aus. Das Zytoplasma der großen Lymphozyten beinhaltet teilweise auch azidophile Granulationen, so daß man sie auch "large granulated lymphocytes" (LGL) nennt. Diesen LGL ordnet man eine "natural killer cell activity" (61, 134) zu. Aktivierte Lymphozyten als Intermediärform zwischen Lymphozyten und Lymphoblasten lassen eine Zunahme des Zelldurchmessers und eine verstärkte Basophilie des Zytoplasmas erkennen (61, 159).

4. Monozyten haben einen Zelldurchmesser von 12 bis 40 µm (61, 62, 105, 159). Das graublaue Zytoplasma beinhaltet gelegentlich einige azidophile Granulationen. Der strähnig angeordnetes Chromatin zeigende Nukleus ist gewöhnlich rund oder nierenförmig, kann aber auch gelappt sein.

4. Makrophagen entwickeln sich aus den Monozyten (62, 127). Sie können körperfremde Stoffe phagozytieren und einen Zelldurchmesser von 60 µm erreichen. Diese Zellen sind sowohl im hellen Zytoplasma als auch im Nukleus hochgradig vakuolisiert. Der oft pyknotische Kern ist zur Zellperipherie verlagert.

5. Neutrophile Granulozyten des Hundes variieren in ihrer Zellgröße zwischen 13 und 16 µm. In der MGG-Färbung stellt sich das Zytoplasma nur angedeutet dar. Der segmentierte Nukleus zeigt 2 bis 4 Chromatinbrücken. Das Kernchromatin selbst erscheint verklumpt.

6. Stabkernige Granulozyten besitzen dieselben charakteristischen Merkmale wie die segmentkernigen Granulozyten, jedoch weist ihr Kern eine klar erkennbare Bandform auf. Als stabkerniger Granulozyt wird eine Zelle dann bezeichnet, wenn der Durchmesser der dünnsten Stelle des Kerns mehr als 1/3 der Durchmesser der beiderseits befindlichen, jeweils dicksten Stelle des Nukleus beträgt (70).

7. Eosinophile Granulozyten unterscheiden sich von den neutrophilen Granulozyten nur durch den gewöhnlich doppelt segmentierten Nukleus und den großen, eosinophilen zytoplasmatischen Einschlüssen.

Juvenile und basophile Granulozyten wurden in äußerst geringer Anzahl bei nur zwei Versuchen beobachtet, so daß sie bei der prozentualen Zellbestimmung nicht berücksichtigt wurden.

(c) Diagnostik der Transplantatinflammation: Berechnung des Increments:

Um auf die im Transplantatgewebe ansässigen und damit für die Transplantatabstoßung verantwortlichen inflammatorischen Zellen bzw. Zelltypen schließen zu können, werden die prozentualen Häufigkeiten einzelner Leukozytenpopulationen bestimmt. Dies erfolgt bei 1000facher Vergrößerung durch dreimalige prozentuale Zelldifferenzierung mit anschließender Mittelwertbildung. Aus der jeweiligen Differenz dieser Häufigkeiten des Biopsieaspirats und der Blutprobe resultiert das "Increment" als Maß der mononukleären Transplantatinfiltration (9, 58, 60, 61, 159, 160). Nach Häyry (63) erlaubt diese Incrementbestimmung, den Beginn, das Ausmaß und den Verlauf einer Abstoßungsreaktion abzuschätzen (Abb. 1): Das vermehrte Auftreten von Lympho- und Plasmablasten bei relativ wenigen Lympho- und Monozyten und keinen Makrophagen kennzeichnet den

Stadien der Abstoßungsreaktion		LB/PB/PC	Ly	Mo	MP
AR 1		++			
("early inflammation")	oder	+	+		
	oder	+	+	+	+
	oder		+	+	(+)
AR 2		+	+	+	+
("full inflammation")	oder	(+)	+	+	+
AR 3			+	+	+
("late inflammation")	oder			+	+
	oder				++

Abb. 1: Einteilung der Stadien von Abstoßungsreaktionen nach Bestimmung des Increments inflammatorischer Zellelemente (63).

Beginn einer Abstoßungsreaktion. Beim Fortschreiten einer solchen Transplantatreaktion erreichen neben den Blasten auch die Lymphozyten und Monozyten ein höheres Increment bei gleichzeitigem, vereinzeltem Auftreten von Makrophagen; es befinden sich also alle Zelltypen im Transplantat. Die Erhöhung der Makrophagenzahl mit relativer Abnahme des Lymphozyten- und Monozyten-Increments sowie das Fehlen bzw. geringe Vorhandensein der Blasten zeigen eine sehr späte Abstoßungsreaktion an, die oft irreversibel ist (63, 67).

Desweiteren erlaubt die TAC infolge der pathologisch-morphologischen Veränderungen der Tubuluszellen und Endothelzellen Rückschlüsse auf den Transplantatzustand. Diese pathologisch-morphologischen Erscheinungen äußern sich in Zellschwellung, Vakuolisierung im Zytoplasma und/oder Kern, Kernpyknose und im Terminalstadium als Erythrophagozytose anderer Zellen. Je nach dem zellulären Begleitbild - also dem bestehenden Increment - weisen diese pathologisch-morphologischen Veränderungen auf eine akute Tubulusnekrose oder eine Abstoßungsreaktion hin.

4.4 Modifikation der Incrementberechnung mittels Coulter Counter:

Es wurde versucht, durch die Einführung weiterer, mit einem Coulter Counter[1)] bestimmter Parameter eine höhere Sensitivität in der Diagnose von Abstoßungsreaktionen zu erreichen.

Bei der Coulter Counter Zählung werden Zellen, die sich in einer Suspension befinden, in eine Kapillare mit definierter Öffnung aufgenommen. In der Kapillare führt die Anzahl der Zellen zu Widerstandsänderungen,

1) Coulter Electronics, Krefeld

was auf einem Oszilloskop als Impulsmuster wiedergegeben wird. Die Widerstandsänderung und damit die Zahl der ausgelösten elektrischen Impulse ist abhängig von der verwendeten Kapillaröffnung und der Zahl der suspendierten Zellen. Durch die vorherige Einstellung der bei der Zählung zu berücksichtigenden minimalen und maximalen Zelldurchmesser wird nur die Zahl der Zellen bestimmt, die innerhalb der gewählten Grenzbereiche liegen. Die Zellzahl wird proportional der ausgelösten elektrischen Impulse digital angezeigt.

Bei der bisherigen Berechnung des Increments berücksichtigt man einzig den Leukozytenanteil im Biopsieaspirat und Blut. Veränderungen des gleichzeitig vorhandenen Anteils an Erythrozyten, beispielsweise bei Verdünnung oder Konzentrierung der Suspensionen, bleiben hingegen unberücksichtigt. Veränderungen des erythrozytären Hintergrundes beeinflussen jedoch unmittelbar die Zahl der Leukozyten in einer Lösung, müssen also in die Incrementberechnung miteinbezogen werden.

Die Coulter Counter Berechnungen zielten somit auf die Berücksichtigung des Erythrozytenanteils und damit auf eine genauere Incrementberechnung.

(a) Durchführung:

Nach Coulter Counter Bestimmungen der Leukozyten und Erythrozyten im Aspirat und Blut wurden durch entsprechende Verdünnung einer Lösung die Koeffizienten der Erythrozytenanteile gleichgesetzt. Der erythrozytäre Hintergrund wurde also in beiden Suspensionen egalisiert. Um keine Änderungen der Erythrozytenkoeffizienten zu verursachen, wurden in die Zytozentrifuge nur konstante Volumina eingesetzt.

Nach Zytozentrifugation und Färbung wurden bei 1000facher Vergrößerung jeweils 300 Zellen des Aspirats und Bluts mit anschließender, entsprechender

Mittelwertbildung prozentual differenziert. Schließlich wurden das "relative" und "absolute" Increment einzelner Leukozytenpopulationen bestimmt.

Als "relativ" wurde das Increment bezeichnet, das sich aus der einfachen Differenzbildung des jeweiligen Prozentwertes der Häufigkeit der im Blut und Aspirat befindlichen Leukozytenpopulationen ergab. Bei der Berechnung des relativen Increments blieb also die Absolutverteilung der einzelnen Leukozytenarten in beiden Suspensionen unbeachtet.

Die Bestimmung des "absoluten" Increments hingegen berücksichtigte die Gesamtzahl der peripheren und in-situ-Leukozyten: Der jeweilige Prozentwert der einzelnen Leukozytenarten wurde mit der Gesamtzahl der im Aspirat bzw. Blut suspendierten Leukozyten multipliziert. Das entsprechende absolute Increment ergab sich aus der Differenzbildung einzelner Zellarten in beiden Suspensionen.

Es wurde weiter untersucht, ob das Aspirat im Zuge von Abstoßungsreaktionen eine Vermehrung der Gesamtleukozyten aufweist: Hierzu wurde der "Inflammationsfaktor" als Quotient der in-situ zu den peripheren Leukozyten bestimmt. Es wurde geprüft, ob in Abhängigkeit vom immunologischen Zustand des Transplantats eine Erhöhung dieses Faktors auftritt.

(b) Tierexperimentelle Versuchsgruppen:

Ein Vergleich der einfachen und modifizierten Incrementberechnungen erfolgte an 14 Biopsien von unter ALG-Behandlung stehenden Allotransplantaten (Versuchsgruppe 6).

Auch wurde die Coulter Counter modifizierte Incrementberechnung zur näheren Analyse der Wirkung einer einmaligen Gabe antilymphozytärer Antikörper (Versuchsgruppe 3) eingesetzt.

(c) Orientierende Untersuchungen bei menschlichen Transplantatempfängern zur diagnostischen Aussagekraft:

Orientierende Untersuchungen zur diagnostischen Aussagefähigkeit der beiden dargestellten Möglichkeiten der Incrementberechnung erfolgten an Feinnadelbiopsien von 4 menschlichen Nierentransplantatempfängern[1].

Abgesehen von der Tatsache, daß menschliche Allotransplantate ohne Lokalanästhesie unter sterilen Bedingungen biopsiert wurden, wurden Bopsieaspirat und Blutproben wie bereits in 4.2 beschrieben gewonnen und verarbeitet.

Die Proben wurden dann zum einen wie bisher, zum anderen nach Coulter Counter Bestimmungen der Leukozyten- und Erythrozytenzahlen sowie nach Gleichsetzung der Erythrozytenanteile untersucht und bewertet.

Diese Untersuchungen zielten auf:

1. den Vergleich der Ergebnisse des prozentualen Auftretens einzelner Zellpopulationen bei beiden Berechnungsmöglichkeiten des Increments,
2. die Erkennung möglicher Unterschiede in Aussage und Beurteilung der FNAB-Ergebnisse vor und nach Berücksichtigung der Erythrozytenkoeffizienten,
3. die Einschätzung und Bewertung eines immunologischen Zustandes eines Transplantats sowohl durch die Gegenüberstellung der absoluten Leukozytenwerte des Biopsieaspirats und Bluts als auch durch die Darstellung des daraus resultierenden Inflammationsfaktors,
4. die Feststellung der Korrelation der Ergebnisse der beiden Berechnungsmöglichkeiten des Increments mit klinischen Befunden und Verläufen.

1) Die Biopsien stammten von Allotransplantatempfängern der University of Wisconsin Hospital and Clinics, Madison, U. S. A.

Bei den dargestellten Untersuchungen menschlicher Transplantatempfänger handelte es sich um eine Blindstudie: Zum Zeitpunkt der FNAB-Beurteilungen lagen keine klinischen Befunde vor.

5. ERGEBNISSE:

5.1 Allogene Hunde-Nierentransplantationen mit (Versuchsgruppe 2) und ohne ALG (Versuchsgruppe 1):

An den Versuchsgruppen 1 und 2 wurden die Wirkungen antilymphozytärer Antikörper im Transplantat und Blut untersucht.

(a) Transplantatfunktionszeit:

In beiden Gruppen wurden die Versuche bei durchschnittlichen Serumharnstoffwerten von 364,1 ± 46,1 mg/100 ml beendet ("Transplantatfunktionszeit"). Unter der Wirkung antilymphozytärer Antikörper wurde diese Transplantatfunktionszeit von 6,5 ± 1,2 Tagen unbehandelter Kontrolltiere (Gruppe 1) auf 11,3 ± 1,2 Tage immunsupprimierter Tiere (Gruppe 2) signifikant ($p < 0,001$) verlängert.

(b) Blutuntersuchungen:

Die Harnstoffwerte (Tab. 4) zeigen bis zum 4. p. op. Tag einen annähernd gleichen Anstieg in beiden Versuchsgruppen. Während jedoch diese Werte in der Gruppe 1 in den Folgetagen stark zunehmen, bildet die ALG-Gruppe mit ihren Werte bis zum 7. p. op. Tag ein Plateau aus. In der Folgezeit steigen jedoch auch in dieser Gruppe die Harnstoffwerte an.

Das Kreatinin (Tab. 4) verhält sich der Harnstoffentwicklung entsprechend.

a)

Tag	präop	1	3	5	6	7	10	11
Leukozyten (x10³/mm³)	8,7±0,9	20,4±5,6	15,3±5,0	11,6±1,6	15,1±5,1	13,6±2,6	22,3±5,1	23,1±6,6
Lymphozyten(x10³/mm³)	2,5±0,3	1,4±0,7	1,0±0,1	0,5±0,2	0,7±0,4	0,6±0,2	1,3±0,6	1,4±0,3
Monozyten (x10³/mm³)	0,5±0,2	0,8±0,4	1,1±0,8	1,1±0,4	1,5±0,5	1,0±0,5	1,7±0,8	1,7±0,6
Hk (Vol %)	41,7±5,5	38,9±3,6	41,3±4,8	33,1±6,6	31,3±8,0	30,4±8,2	28,0±7,8	23,3±1,5
Harnstoff (mg %)	41,4±14,9	83,3±12,8	126,3±22,0	120,0±20,5	136,7±48,3	179,3±66,2	324,4±108,0	376,5±100,5
Kreatinin (mg %)	1,3±0,2	2,9±0,4	2,9±0,6	3,2±0,6	3,4±0,8	4,0±1,2	7,2±3,0	8,4±3,3
Natrium (mmol/l)	142±12	142±8	147±9	146±9	145±11	147±11	146±13	152±4
Kalium (mmol/l)	3,6±0,5	4,5±0,5	3,9±0,6	3,2±0,3	3,3±0,5	3,0±1,0	3,7±0,9	3,3±0,4

b)

Leukozyten (x10³/mm³)	7,3±2,5	24,1±3,5	18,4±5,1	26,8±5,2	27,4±4,5
Lymphozyten(x10³/mm³)	2,2±0,3	2,1±0,1	2,0±0,2	2,4±0,5	2,2±0,4
Monozyten (x10³/mm³)	0,5±0,3	0,8±0,5	0,7±0,1	1,0±0,3	1,1±0,2
Hk (Vol %)	46,8±1,5	43,5±5,7	33,0±7,3	29,0±6,4	21,8±14,1
Harnstoff (mg %)	27,0±3,3	70,7±23,0	108,7±16,3	207,0±43,0	302,0±47,1
Kreatinin (mg %)	1,3±0,4	2,7±0,6	3,4±0,5	5,2±0,7	7,5±1,1
Natrium (mmol/l)	143±3	139±7	142±3	138±3	145±14
Kalium (mmol/l)	4,1±0,8	4,9±0,9	3,7±0,2	2,9±0,5	3,4±0,5

Tab. 4: Serumparameter von Bastardhunden nach allogener Nierentransplantation der Versuchsgruppen 1 u. 2 (a: ALG-Immunsuppression, b: ohne Immunsuppression).

Sowohl bei unbehandelten als auch immunsupprimierten Tieren erhöhen sich die Leukozyten (Tab. 4) am 1. p. op. Tag. Es schließt sich eine Abnahme dieser Zellen an. Bei Erhöhung der renalen Retentionsparameter zeigen alle Tiere eine Leukozytose.

Während der gesamten Beobachtungszeit sind die Lymphozyten (Tab. 4) in der Versuchsgruppe 2 signifikant vermindert ($p < 0{,}001$). Diese Lymphopenie wird von einer Monozytose (Tab. 4) begleitet.

Zur Verbesserung der Mikrozirkulation zielte die p. op. Infusionstherapie auf Hk-Einstellungen (Tab. 4) zwischen 30% und 40%. Mit Verschlechterung der Retentionswerte und damit der Transplantatfunktion nahmen diese Werte ab.

Die Messungen der Serumelektrolyte (Tab. 4) zeigen keine spezifisch deutbaren Verlaufsänderungen während der Versuche.

(c) Histologie:

Bei den nicht immunsupprimierten Tieren weisen die Gefäße, insbesondere die "mittelgroßen und kleineren Arterien, fibrinoide Wandnekrosen mit stenosierenden bis obliterierenden fibrinoiden Thromben" auf. Perivaskulär waren die interstitiellen Rundzellinfiltrate ausgeprägter. Im Interstitium fanden sich dichte Zellinfiltrate, bestehend aus Lymphozyten, lymphoiden Zellen, Plasmazellen, Makrophagen und teilweise auch Granulozyten und Monozyten. Bei allen unbehandelten Transplantaten zeigte sich ein hochgradiges interstitielles Ödem und eine teilweise fortgeschrittene Nekrose. Die degenerativ veränderten Tubuli wiesen

ebenfalls Nekrosen auf. Auch die partiell mit Fibrinthromben ausgefüllten Glomeruli waren nekrotisch.

Die histologischen Untersuchungen der unter ALG-Einfluß stehenden Transplantate der Versuchsgruppe 2 zeigten nur in einem Fall eine Akzentuierung des interstitiellen Zellinfiltrats der Gefäße; in den anderen Fällen waren die Gefäße unverändert. Die Interstitien dieser Transplantate waren durchweg ödematös alteriert und zeigten "wenig bis mäßig dichte Rundzellinfiltrate", die hauptsächlich aus "Lymphozyten, lymphoiden Zellen, Plasmazellen und vereinzelt auch aus Granulozyten" bestanden. Die Tubulusepithelien waren abgeflacht, die Tubuli selbst dilatiert. Die Glomeruli waren histologisch unauffällig.

Bei den Kontrolltieren der Gruppe 1 wurden die Abstoßungsreaktionen insgesamt als "akut zellulär und humoral bei teilweise fortgeschrittener Transplantatnekrose", bei den ALG immunsupprimierten Tieren der Gruppe 2 als "wenig bis mäßig zellulär bei schwererer humoraler Reaktion" bewertet.

(d) Fluktuationen einzelner Leukozytenpopulationen:

Die nicht immunsupprimierten Tiere der Gruppe 1 beginnen die Abstoßungsreaktion am 3. Tag: Dieser Beginn ist durch eine starke in-situ-Inflammation der Lymphozyten (Abb. 2) und Lymphoblasten (Abb. 3) charakterisiert. Auch Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 4) sowie Monozyten (Abb. 5) und Makrophagen (Abb. 6) wandern zu diesem Zeitpunkt in das Transplantat ein. Während der Lymphoblasten- (Abb. 3) und Makrophageninflux (Abb. 6) bis zum letzten Versuchstag anhält, nehmen Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 4) konstante Werte an. Die Monozyteninflammation (Abb. 5) steigt nur langsam bis zum letzten

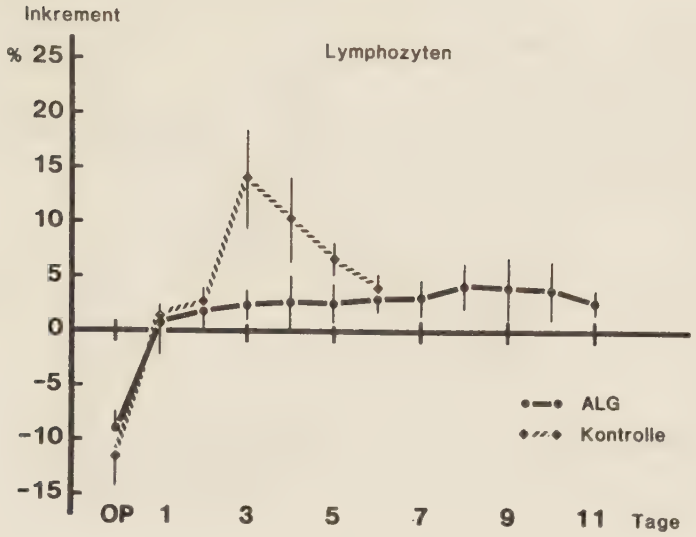


Abb. 2: Entwicklung des Lymphozytenincrements in unbehandelten und ALG-immunsupprimierten Hundennieren-Allotransplantaten (Versuchsgruppen 1 u. 2).

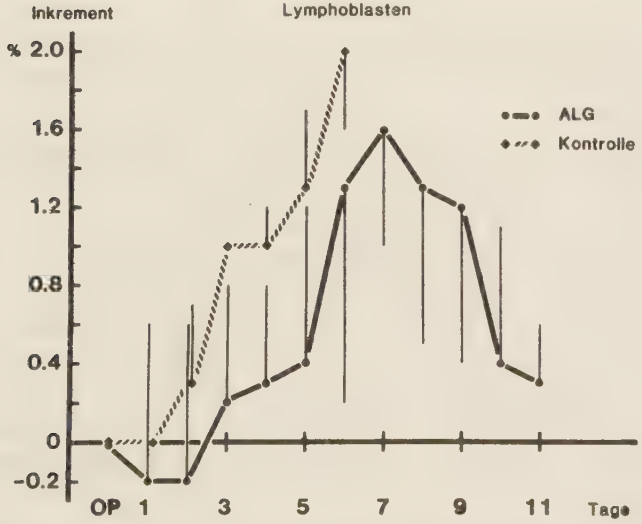


Abb. 3: Entwicklung des Lymphoblastenincrements in unbehandelten und ALG-immunsupprimierten Hundennieren-Allotransplantaten (Versuchsgruppen 1 u. 2).

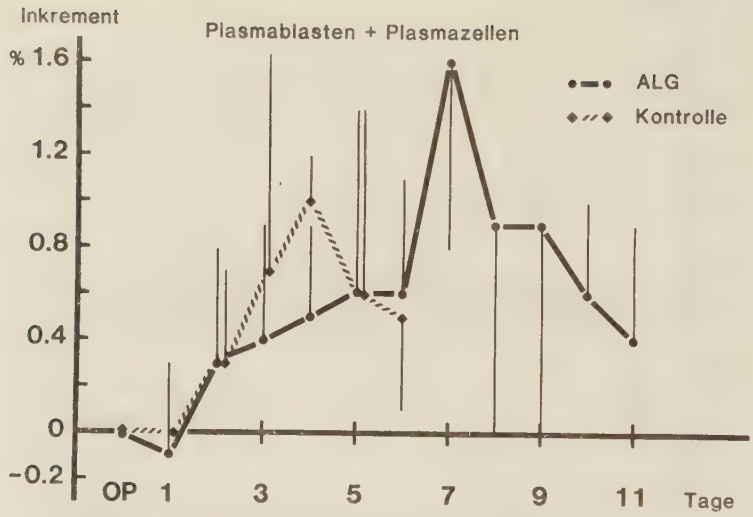


Abb. 4: Entwicklung des Plasmablasten- und Plasmazellenincrements in unbehandelten und ALG-immunsupprimierten Hundennieren-Allotransplantaten (Versuchsgruppen 1 u. 2).

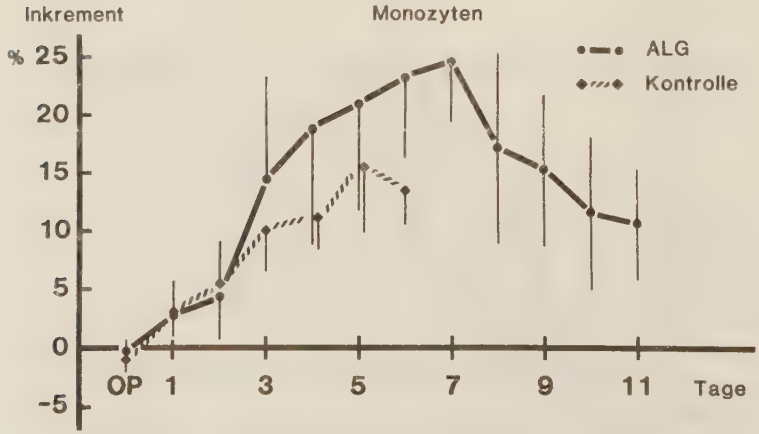


Abb. 5: Entwicklung des Monozytenincrements in unbehandelten und ALG-immunsupprimierten Hundennieren-Allotransplantaten (Versuchsgruppen 1 u. 2).

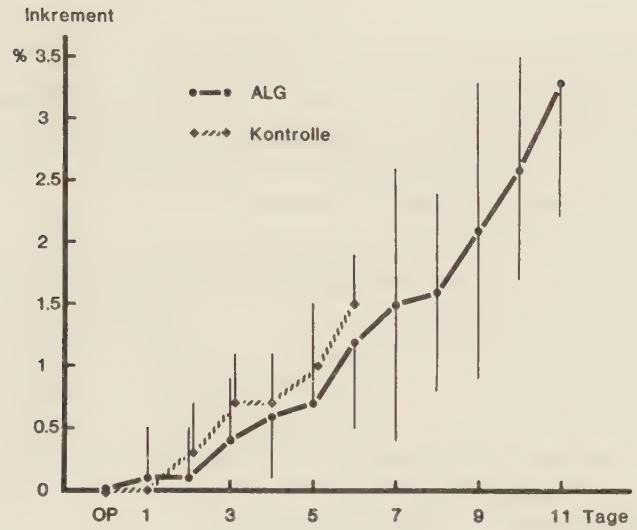


Abb. 6: Makrophagenentwicklung in unbehandelten und ALG-immunsupprimierten Hundennieren-Allotransplantaten (Versuchsgruppen 1 u. 2).

Tag an. Die Lymphozyten (Abb. 2) nehmen nach dem 3 p. op. Tag im Transplantat ab.

Unter ALG-Therapie ist der Beginn der Abstoßungsreaktion weniger auffällig: Zunächst verhalten sich in beiden Versuchsgruppen bis zum 2. Tag Lymphozyten (Abb. 2), Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 4) sowie auch Monozyten (Abb. 5) gleich; Lymphoblasten (Abb. 3) sind noch nicht im Transplantat nachweisbar. Am Folgetag erhöht sich zwar der Anteil an Lymphozyten (Abb. 2) in behandelten Transplantaten leicht, ihr Anstieg mit folgendem Plateau ist aber deutlich geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe (Abb. 2). Dagegen erkennt man in der Gruppe 2 einen verstärkten Monozyteninflux (Abb. 5) und eine Verzögerung des Inflammationsbeginns sowohl der Lymphoblasten (Abb. 3) als auch der Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 4).

Die Makrophageninfiltration (Abb. 6) verhält sich in beiden Versuchsgruppen gleich. In behandelten und unbehandelten Transplantaten gehen zu Zeitpunkten verstärkter Makrophageninflammationen (Abb. 6) die Monozytenincremente (Abb. 5) zurück.

Der Höhepunkt der Abstoßungsreaktion findet unter ALG-Therapie schließlich am 7. p. op. Tag statt: Lymphoblasten (Abb. 3) erreichen einen niedrigeren, die Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 4) einen höheren Maximalwert gegenüber der Kontrollgruppe. Die Monozyten (Abb. 5) zeigen nach starker Zunahme ein Incrementmaximum. Die Lymphozyten (Abb. 2) bilden ein Plateau und sind unter dem Einfluß des ALG an diesem Abstoßungshöhepunkt offensichtlich unbeteiligt.

Die in-situ-Wirkung des ALG stellt sich ausgeprägt zwischen dem 2. und 3. Tag dar. Sie besteht in einer signifikanten in-situ-Reduktion der Lymphozyten ($p < 0,05$) und Lymphoblasten ($p < 0,05$). Diese in-situ-Reduktionen (Abb. 2, 3) werden im Blut von einer deutlichen Lymphopenie (Tab. 4) begleitet. Zu demselben Zeitpunkt findet man eine monozytäre Transplantatinflammation (Abb. 5) bei peripherer Monozytose (Tab. 4). Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 4) zeigen zwar einen gering verzögerten Incrementanstieg, lassen aber einen höheren Maximalwert als in unbehandelten Transplantaten erkennen. Stabkernige Granulozyten (Abb. 7a) sind gleichmäßig im Blut und Transplantat anzutreffen. Auf segmentkernige Granulozyten (Abb. 7b) scheint ALG keine spezifische Wirkung zu haben: Aufgrund der Technik der prozentualen Leukozytendifferenzierung sind ihre Abfälle und Minima von Anstiegen und Maxima behandelter und unbehandelter Monozyten bzw. Lymphozyten begleitet. In beiden Versuchsgruppen treten nur geringe Unterschiede in den Incremententwicklungen eosinophiler Granulozyten (Abb. 7c) auf.

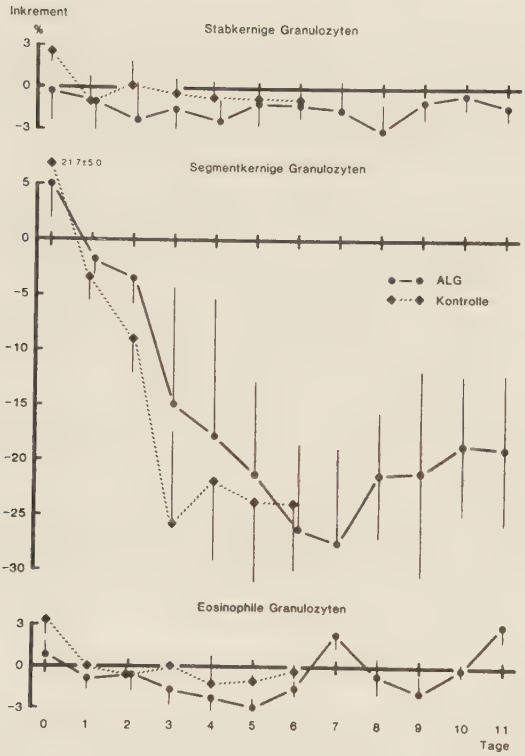


Abb. 7: Entwicklung des Increments einzelner Granulozytenformen in unbehandelten und ALG-immunsupprimierten Hundennieren-Allotransplantaten (Versuchsgruppen 1 u. 2).
(a) stabkernige Granulozyten,
(b) segmentkernige Granulozyten,
(c) eosinophile Granulozyten.

5.2 Analyse der unmittelbaren Wirkungen einer einmaligen ALG-Applikation nach allogenen Hunde-Nierentransplantationen (Versuchsgruppe 3):

Am 7. p. op. Tag wurden in kurzen Intervallen Feinnadelbiopsien nach Relaparotomie unter Sicht durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten der Analyse unmittelbarer Veränderungen einzelner Leukozytenpopulationen im Transplantat, Blut und Increment durch den Einfluß antilymphozytärer Antikörper.

(a) Zeitpunkt der Ausführung der Untersuchungen:

Es wurde als Untersuchugszeitpunkt der 7. p. op. Tag gewählt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die TAC-Ergebnisse der Versuchsgruppe 2 eine ausgeprägte zelluläre Transplantatinfiltration.

(b) Blutparameter:

Die Ergebnisse der Bestimmungen einzelner Blutparameter dieser Versuchsgruppe koinzidieren mit denen der Versuchsgruppe 2.

Die Harnstoff- und Kreatininwerte (Tab. 5) bilden nach anfänglichem Anstieg bis zum 7. p. op. Tag ein Plateau.

Während des gesamten Beobachtungszeitraums zeigt sich eine gering ausgeprägte Leukozytose (Tab. 5).

Die Zahl der Lymphozyten (Tab. 5) ist signifikant erniedrigt ($p < 0{,}001$). Die Lymphopenie wird von einer Monozytose (Tab. 5) begleitet.

Die Messungen des Hk und der Serumelektrolyte (Tab. 5) zeigen keine spezifisch deutbaren Verlaufsänderungen während der Versuche.

Tag	präop	1	3	5	7
Leukozyten (x10³/mm³)	8,2±1,1	19,3±5,7	17,7±5,9	13,2±2,4	12,5±5,0
Lymphozyten(x10³/mm³)	2,3±0,3	1,3±0,2	0,7±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1
Monozyten (x10³/mm³)	0,4±0,1	0,6±0,2	0,9±0,2	1,4±0,3	1,2±0,1
Hk (Vol %)	42,4±4,6	37,6±4,2	36,2±2,3	35,0±2,7	35,6±3,3
Harnstoff (mg %)	31,8±9,1	82,6±11,9	97,4±14,6	81,8±23,0	112,4±19,9
Kreatinin (mg %)	1,0±0,2	2,4±0,3	2,4±0,1	2,2±0,2	2,8±0,3
Natrium (mmol/l)	142±6	139±4	138±5	136±5	137±8
Kalium (mmol/l)	4,1±0,5	4,5±0,5	4,2±0,4	4,3±0,7	4,3±0,6

Tab. 5: Serumparameter von Bastardhunden nach allogener Nierentransplantation unter dem Einfluß des ALG (Versuchsgruppe 3).

(c) Unmittelbare Veränderungen des weißen Blutbildes nach einer ALG-Applikation:

Im Blut stellt sich nach ALG-Gabe innerhalb von 30 Minuten eine stark ausgeprägte Leukopenie (Abb. 8a), von der jede Leukozytenart betroffen ist, ein. Der leukozytäre Ausgangswert wird erst nach 13 Stunden wieder angeglichen. Die einzelnen Leukozytenpopulationen erholen sich jedoch unterschiedlich schnell:

Lymphozyten (Abb. 8b) sind signifikant reduziert ($p < 0,001$). Ihr Minimum zeigt nach 6 Stunden ein anhaltendes Plateau. Der sich anschließende Anstieg erfolgt langsam. Eine Angleichung an die Ausgangshöhe findet nicht statt; nur 68,2% dieses Wertes werden nach 14 Stunden erreicht.

Monozyten (Abb. 8b) hingegen gleichen nach 3,5 Stunden ihren Ausgangswert wieder an und übersteigen diesen in der Folgezeit.

Auch die einzelnen Granulozytenpopulationen vermindern sich unter der Wirkung des ALG. Stabkernige Granulozyten (Abb. 8c) erholen sich nach Bildung eines

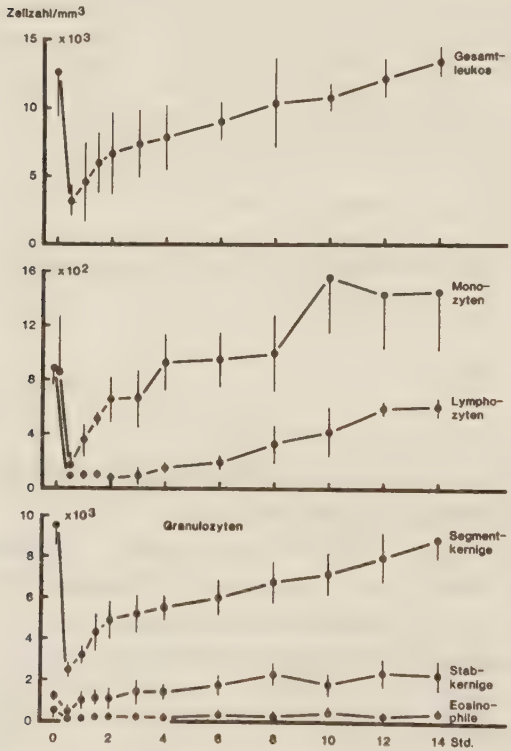


Abb. 8: Veränderung der Gesamtleukozyten und einzelner Leukozytenpopulationen im Blut nach einer einmaligen ALG-Applikation (Versuchsgruppe 3)
(a) Gesamtleukozyten,
(b) Lymphozyten und Monozyten,
(c) stabkernige, segmentkernige und eosinophile Granulozyten.

Minimalwertes schnell und überschreiten bereits nach 2 Stunden ihre Ausgangshöhen. Die Regeneration der segmentkernigen Granulozyten (Abb. 8c) erfolgt langsamer. Auch die eosinophilen Granulozyten (Abb. 8c) zeigen nach Erreichen eines Minimums einen kontinuierlichen Anstieg im Blut.

(d) Unmittelbare Veränderungen einzelner Leukozyten im Transplantat und Increment:

Lymphozyten nehmen unmittelbar nach ALG-Applikation stärker im Increment als im Transplantat (Abb. 9a) zu. Die während des gesamten Beobachtungszeitraums sich einstellende signifikante in-situ-Reduktion dieser Zellpopulation ($p < 0{,}001$) läßt sich jedoch nur aus der direkten Beobachtung ihres Verlaufs im Transplantat (Abb. 9a) ableiten.

Die im Blut nicht nachweisbaren Lymphoblasten (Abb. 9b) erreichen nach 2 Stunden ein Minimum; der Ausgangswert wird nach 14 Stunden noch nicht erreicht.

Der Abfall der in-situ-Monozyten (Abb. 9c) erfolgt nicht nur langsamer, sondern ist auch geringer ausgeprägt als der der Lymphozyten (Abb. 9a) und Lymphoblasten (Abb. 9b). Nach 8,5 Stunden egalisieren und überschreiten die Monozyten ihre Ausgangshöhen (Abb. 9c). Abweichend von dem Verhalten der in-situ-Monozyten verhält sich das Monozytenincrement (Abb. 9c). Es zeigt nur eine langsame Erhöhung und die Angleichung des Ausgangswertes nach 12 Stunden. Monozyten wandern also unmittelbar nach peripherer Bereitstellung in das Transplantat ein.

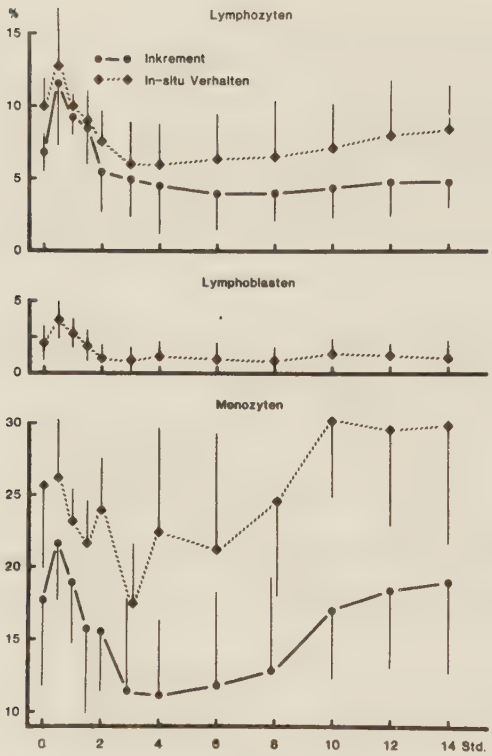


Abb. 9: Entwicklung der Incremente und des in-situ-Verhaltens einzelner Leukozytenpopulationen nach einer einmaligen ALG-Applikation (Versuchsgruppe 3)
(a) Lymphozyten,
(b) Lymphoblasten,
(c) Monozyten.

ALG bewirkt bei Plasmablasten und Plasmazellen sowie bei Makrophagen eine - wenn auch nur sehr schwache - in-situ-Verminderung (Tab. 6).

Zeit	Plasmazellen u. -blasten	Makrophagen
0	1,3 ± 0,8	1,2 ± 0,6
0,5	1,4 ± 0,8	1,3 ± 1,3
1	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,6
1,5	1,6 ± 1,1	1,5 ± 1,3
2	1,3 ± 0,8	1,5 ± 1,3
3	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,9
4	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,8
6	1,1 ± 1,0	1,2 ± 0,9
8	1,0 ± 0,6	1,1 ± 0,9
10	0,9 ± 0,9	1,0 ± 0,7
12	1,2 ± 1,3	1,2 ± 1,9
14	1,6 ± 1,0	1,0 ± 1,2

Tab. 6: Verhalten der Plasmazellen und Plasmablasten sowie der Makrophagen im Transplantat nach einer einmaligen ALG-Applikation (Versuchsgruppe 3).

Auch segmentkernige und eosinophile Granulozyten werden im Transplantat durch antilymphozytäre Antikörper nur wenig beeinflußt (Tab. 7). Stabkernige Granulozyten hingegen steigen unmittelbar nach ALG-Gabe in situ an und zeigen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes erhöhte Werte (Tab. 7).

Zeit	Segmentkernige	Stabkernige	Eosinophile
0	53,2 ± 9,1	5,4 ± 2,2	1,2 ± 1,3
0,5	47,1 ± 8,7	6,3 ± 2,8	0,9 ± 0,9
1	51,1 ± 2,7	9,6 ± 0,5	0,8 ± 0,3
1,5	55,0 ± 4,2	8,0 ± 2,0	0,6 ± 0,3
2	61,8 ± 7,3	7,4 ± 3,0	0,6 ± 0,9
3	67,2 ± 9,9	8,1 ± 3,6	0,7 ± 1,0
4	59,9 ± 6,7	7,9 ± 3,2	0,6 ± 0,7
6	59,3 ± 9,4	7,8 ± 2,8	0,9 ± 0,4
8	57,8 ± 8,6	7,6 ± 1,7	0,8 ± 0,4
10	50,4 ± 9,5	7,4 ± 1,8	0,8 ± 0,8
12	59,7 ± 7,6	8,3 ± 2,8	1,0 ± 0,7
14	48,9 ± 9,3	8,2 ± 3,1	1,1 ± 1,5

Tab. 7: Verhalten einzelner Granulozytenpopulationen im Transplantat nach einer einmaligen ALG-Applikation (Versuchsgruppe 3).

5.3 Autologe Hunde-Nierentransplantationen mit und ohne ALG (Versuchsgruppen 4 und 5):

Es wurden 4 autologe Hunde-Nierentransplantationen durchgeführt. 2 dieser Tiere erhielten eine p. op. ALG-Immunsuppression in der beschriebenen Dosierung (Versuchsgruppe 4). Die anderen beiden Hunde wurden p. op. nicht mit ALG behandelt (Versuchsgruppe 5). An diesen Versuchsgruppen wurde überprüft, ob bei Ausschluß des Auftretens einer Abstoßungsreaktion infolge fehlender alloantigener Stimulation die FNAB-Ergebnisse auch tatsächlich keine Hinweise auf das Vorliegen einer immunulogischen Transplantatreaktion ergaben. Trotz des Fehlens eines alloantigenen Reizes erhielten die Tiere der Versuchsgruppe 4 ALG. In diesem Versuchsmodell sollte untersucht werden, ob antilymphozytäre Antikörper unspezifische Wirkungen, insbesondere auf einzelne Zellpopulationen im Transplantat und Blut, zeigen.

Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden 14 Tage beobachtet.

(a) Blutuntersuchungen:

Tiere mit behandelten Autotransplantaten (Tab. 8a) zeigen nach einer kurzen p. op. Leukozytose unauffällige Leukozytenwerte.

Lymphozyten (Tab. 8a) sind unter ALG-Wirkung signifikant ($p < 0,001$) vermindert.

Monozyten (Tab. 8a) verhalten sich unauffällig.

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes fällt jedoch in der Versuchsgruppe 4 eine leichte Erhöhung des Serumharnstoffs (Tab. 8a) auf. Das Serumkreatinin (Tab. 8a) erreicht nach anfänglich leichtem Anstieg Normalwerte.

Unauffällig verhalten sich die Werte des Hk und der Serumelektrolyte (Tab. 8a).

Tag	präop	1	3	5	7	10	12	14
Leukozyten (x10³/mm³)	10,0±1,2	20,3±1,5	15,8±2,1	11,6±0,2	12,3±2,0	10,8±0,7	11,1±0,8	10,4±0,6
Lymphozyten(x10³/mm³)	2,5±0,1	1,2±0,1	0,9±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1
Monozyten (x10³/mm³)	0,5±0,1	0,5±0,2	0,5±0,2	0,7±0,1	0,6±0,2	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1
Hk (Vol %)	40,5±3,5	37,5±2,1	34,5±0,7	34,0±1,4	35,5±2,1	35,0±2,8	34,0±1,4	35,5±0,7
Harnstoff (mg %)	18,5±9,2	73,5±8,5	96,0±5,7	98,5±8,5	125,5±24	125,5±11,3	98,0±14,1	96,0±11,3
Kreatinin (mg %)	1,2±0,1	1,6±0,1	1,6±0,1	1,5±0,1	1,3±0,0	1,2±0,0	1,2±0,1	1,2±0,0
Natrium (mmol/l)	144±7	145±6	146±4	145±4	146±1	144±2	145±1	145±3
Kalium (mmol/l)	4,3±0,6	4,4±0,5	4,3±0,4	4,5±0,5	4,4±0,6	4,5±0,4	4,4±0,1	4,5±0,2

Tab.8a: Serumparameter von Bastardhunden nach autogener Nierentransplantation unter dem Einfluß des ALG (Versuchsgruppe 4).

Tag	präop	1	3	5	7	10	12	14
Leukozyten (x10³/mm³)	9,5±1,1	22,6±2,4	13,0±1,9	10,4±5,1	7,3±3,6	9,7±1,5	7,8±2,0	9,0±0,3
Lymphozyten(x10³/mm³)	2,5±0,1	2,4±0,2	2,3±0,2	2,4±0,1	2,2±0,0	2,3±0,2	2,3±0,1	2,5±0,1
Monozyten (x10³/mm³)	0,5±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,6±0,2	0,7±0,1	0,7±0,2	0,6±0,2	0,6±0,1
Hk (Vol %)	37,5±0,7	32,0±4,2	34,5±0,7	35,0±2,8	34,5±3,5	35,5±0,7	36,0±4,2	36,5±2,1
Harnstoff (mg %)	21,0±5,7	62,5±6,4	41,5±12,0	39,5±9,2	44,0±2,8	40,5±10,6	48,0±8,5	44,0±2,8
Kreatinin (mg %)	1,3±0,1	1,6±0,1	1,5±0,2	1,2±0,0	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,0	1,1±0,2
Natrium (mmol/l)	143±1	143±1	143±2	143±3	141±3	145±4	148±5,7	144±2
Kalium (mmol/l)	4,0±0,5	4,5±0,3	4,4±0,1	4,3±0,1	4,2±0,1	4,4±0,4	4,5±0,2	4,4±0,1

In der Versuchsgruppe 5 (Tab. 8b) weisen nach kurzfristiger Erhöhung einzelner Parameter alle Blutbestimmungen bis zum Ende der Versuche Normalwerte auf.

(b) Zuverlässigkeit der FNAB-Ergebnisse:

Alle Leukozytenpopulationen sind sowohl bei mit ALG behandelten (Versuchsgruppe 4) als auch bei unbehandelten (Versuchsgruppe 5) Autotransplantaten gleichmäßig im Transplantat und Blut verteilt. Insbesondere aus den Incrementwerten der mononukleären Zellen (Abb. 10) sowie aus dem Fehlen von Lymphoblasten, Plasmablasten und Plasmazellen im Transplantat und

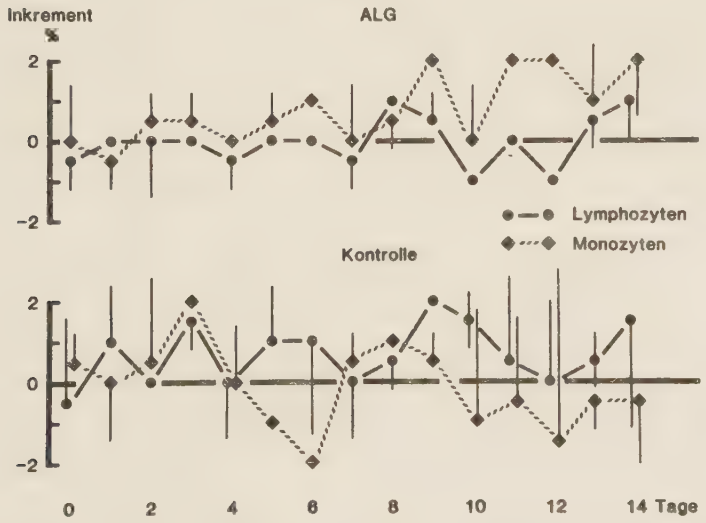


Abb. 10: Entwicklung der Incremente von Lymphozyten und Monozyten in autologen Hunde-Nierentransplantaten
(a) unter ALG-Wirkung (Versuchsgruppe 4),
(b) ohne immunsuppressive Therapie (Versuchsgruppe 5).

Blut ergeben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer Abstoßungsreaktion. Auch die Incremente der einzelnen Granulozytenformen sind ausgeglichen (Tab. 9).

Zeit (Tg)	Segmentkernige	Stabkernige	Eosinophile
0	3,0 ± 1,4	-3,0 ± 0,0	-0,5 ± 0,7
1	3,5 ± 2,1	-4,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2	2,5 ± 0,7	-0,5 ± 0,7	-0,5 ± 0,7
3	0,0 ± 2,8	1,0 ± 0,0	-2,5 ± 2,1
4	-2,0 ± 0,0	0,5 ± 2,1	-0,5 ± 0,7
5	-3,0 ± 5,7	0,0 ± 1,4	-0,5 ± 0,7
6	3,0 ± 0,0	-3,5 ± 0,7	-0,5 ± 0,7
7	2,0 ± 2,8	-2,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0
8	-1,5 ± 6,4	-0,5 ± 3,5	0,5 ± 2,1
9	0,0 ± 7,0	-1,0 ± 4,2	-1,0 ± 1,4
10	2,5 ± 2,1	-2,0 ± 4,2	0,5 ± 0,7
11	0,5 ± 0,7	-2,5 ± 2,1	0,0 ± 1,4
12	1,0 ± 1,4	-3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
13	-1,5 ± 4,9	-0,5 ± 2,1	0,0 ± 1,4
14	-1,5 ± 4,9	-1,0 ± 2,8	-0,5 ± 0,7

Tab. 9a: Incrementwerte einzelner Granulozytenformen nach autologer Hunde-Nierentransplantation unter Wirkung des ALG (Versuchsgruppe 4).

Zeit (Tg)	Segmentkernige	Stabkernige	Eosinophile
0	-0,5 ± 3,5	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0
1	-1,0 ± 1,4	0,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0
2	-1,5 ± 2,1	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,7
3	-3,0 ± 2,8	0,0 ± 1,4	0,0 ± 0,0
4	1,5 ± 0,7	-1,5 ± 1,4	0,0 ± 1,4
5	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 1,4
6	-2,5 ± 4,9	2,0 ± 1,4	1,5 ± 1,4
7	-1,5 ± 2,1	2,0 ± 0,0	-0,5 ± 0,7
8	-1,0 ± 1,4	0,5 ± 2,1	-1,0 ± 0,0
9	-3,5 ± 2,1	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,7
10	-2,5 ± 3,5	0,5 ± 0,7	1,5 ± 0,7
11	0,0 ± 1,4	-1,5 ± 2,1	1,0 ± 0,0
12	3,0 ± 5,7	-1,0 ± 0,0	-0,5 ± 0,7
13	1,0 ± 1,4	-0,5 ± 0,7	-1,0 ± 0,0
14	-2,0 ± 4,2	2,0 ± 1,4	-1,0 ± 0,0

Tab. 9b: Incrementwerte einzelner Granulozytenformen nach autologer Hunde-Nierentransplantation (Versuchsgruppe 4)

(c) Unspezifische ALG-Wirkung auf Autotransplantate:

ALG bewirkt nach autologer Transplantation sowohl im Transplantat (Abb. 11a) als auch im Blut (Tab. 8a) eine signifikante Reduktion der Lymphozytenzahl ($p < 0,001$).

Weder in-situ-(Abb. 11b) noch periphere (Tab. 8) Monozyten zeigen beim Vergleich der Versuchsgruppen 4 und 5 Unterschiede.

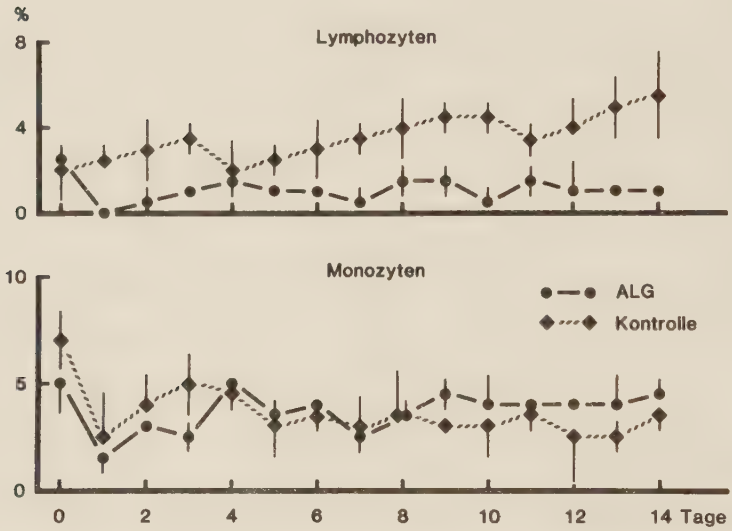


Abb. 11: Veränderungen der in-situ-Verteilungen mononukleärer Zellen in autologen Hunde-Nierentransplantaten unter ALG-Wirkung und ohne immunsuppressive Therapie
(a) Lymphozyten,
(b) Monozyten.

Eine ALG-Applikation nach Autotransplantation führt also neben einer leichten Erhöhung des Serumharnstoffs zu einer signifikanten Abnahme von Lymphozyten im Transplantat und Blut.

5.4 Nebenwirkungen der FNAB:

Biopsien des Nierenbeckens verursachten am Beginn der Versuche bei drei Tieren ausgeprägte intrarenale Blutungen mit anschließender Koagelbildung. Die Koagel verschlossen schließlich das gesamte Pyelon und führten zum Verlust des Transplantats. Diese Tiere wurden nicht in die Versuchsgruppen aufgenommen. Klinisch erkannte man diese Komplikation an Makrohämaturie mit anschließender Oligurie und Anurie. Auch die schnelle Applikation von Infusionslösungen und Diuretika mit dem Ziel, den Durchfluß im Nierenbecken zu erhöhen, konnte bei keinem Tier den Verlust des Transplantats verhindern.

Punktionen des Cortex renis, also am kontrahiliären Rand oder an einem der Pole, ließen in den weiteren Versuchen keine Komplikationen erkennen.

Obwohl die täglichen Biopsien bei Hunden unter nicht sterilen Bedingungen ausgeführt wurden, gab es weder klinisch noch pathologisch-histologisch Hinweise auf eine durch die FNAB induzierte Infektion.

5.5 Modifikation der Incrementberechnung mittels Coulter Counter:

Die bisherige Anwendung der FNAB berücksichtigt zur Bestimmung des Increments den erythrozytären Hintergrund der Aspirat- und Blutsuspension nicht. Da aber Veränderungen dieser Erythrozytenkoeffizienten zwangsläufig auch zu Veränderungen des Leukozytenanteils führen, zielte die Berücksichtigung des erythrozytären Hintergrundes auf eine genauere Bestimmung des Increments.

Die Coulter Counter modifizierte FNAB wurde angewandt:

1. bei 14 Biopsien von 2 ALG immunsupprimierten allogenen Hunde-Nierentransplantaten bis zum Tage der Intervallbiopsien (Versuchsgruppe 6),
2. bei der Untersuchung der Wirkung antilymphozytärer Antikörper nach einmaliger Applikation (Versuchsgruppe 3) mit dem Ziel, unter Einbeziehung der bereits dargestellten Untersuchungsergebnisse die ALG-Wirkung noch näher bestimmen zu können,
3. als orientierende Untersuchungen bei menschlichen Nierentransplantatempfängern, wobei im Sinne einer Blindstudie zum Zeitpunkt der diagnostischen Wertung der FNAB-Ergebnisse keine klinischen Befunde und Verläufe vorlagen.

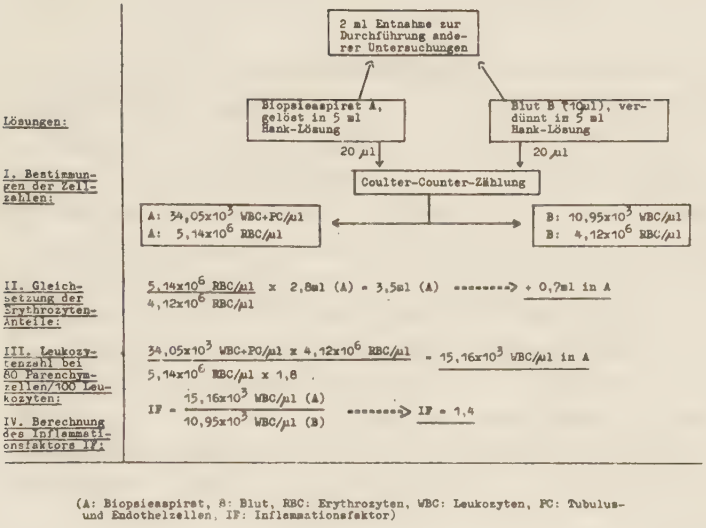
Als Parameter zur Abschätzung des immunologischen Transplantatzustandes dienten - wie in 4.4 (a) näher beschrieben - das relative und absolute Increment, die relativen und absoluten in-situ-Zellverteilungen und der Inflammationsfaktor.

(a) Darstellung der Berechnung:

Durch Coulter Counter Zählungen (Abb. 12) werden zunächst die Zahl der Erythrozyten, Leukozyten und Parenchymzellen im Aspirat sowie die der Erythrozyten und Leukozyten im Blut bestimmt (I in Abb. 12).

Man bildet das Verhältnis der Zahl der Erythrozyten im Aspirat und Blut. Diesen Quotienten multipliziert man dann mit dem Volumen der Lösung, die verdünnt werden soll. Als Ergebnis erhält man den Volumenanteil, den man einer der beiden Suspensionen zugeben muß, um die Erythrozytenanteile anzugleichen (II in Abb. 12).

Da sich im Aspirat jedoch in der Fraktion der kernhaltigen Zellen Tubulus- und Endothelzellen befinden, muß nach Zytozentrifugation und Färbung noch dieser Parenchymzellanteil bestimmt werden. Dies erfolgt in der Weise, daß man die auf 100 Leukozyten entfallenden



(A: Biopsieaspirat, B: Blut, RBC: Erythrozyten, WBC: Leukozyten, FC: Tubulus- und Endothelzellen, IF: Inflammationsfaktor)

Abb. 12: Darstellung der modifizierten Incrementberechnung am Beispiel des Biopsieaspirats und Bluts eines Tieres der Versuchsgruppe 6.

Tubulus- und Endothelzellen zählt. Dividiert man schließlich die durch Coulter Counter ermittelte Zahl kernhaltiger Zellen - bestehend aus Leukozyten und Parenchymzellen - durch die sich nach mikroskopischer Auszählung ergebende Zahl der auf 100 Leukozyten entfallenden Tubulus- und Endothelzellen (als Division durch das Vielfache von 1), so erhält man den Anteil der tatsächlich im Aspirat suspendierten Leukozyten (III in Abb. 12).

Das Verhältnis der im Aspirat befindlichen Leukozyten zu den im Blut suspendierten führt zur Berechnung des Inflammationsfaktors (IV in Abb. 12).

Die dargestellten Coulter Counter Berechnungen besitzen noch den weiteren, wichtigen Vorteil, als

Indikatoren der Repräsentativität der FNAB herangezogen werden zu können:

Während der Intervallbiopsien der Versuchsgruppe 3 wurden beim Tier 3 nach der 2. Stunde der einmaligen ALG-Applikation 28,5 x 10^3 Leukozyten und Parenchymzellen/µl bei 9,21 x 10^6 Erythrozyten/µl in der Aspiratsuspension bestimmt. Im Blut wurden 9,93 x 10^3 Leukozyten/µl und 3,4 x 10^6 Erythrozyten/µl festgestellt. Nach Gleichsetzung der Erythrozytenkoeffizienten und Berücksichtigung der Parenchymzellen - 6 Endothelzellen/100 Leukozyten bei mikroskopischer Differenzierung - verminderte sich entsprechend die Zahl der Leukozyten im Aspriat auf 9,92 x 10^3/µl. Aspirat- und Blutsuspension zeigten also denselben Leukozytenanteil. Die Biopsie war nicht repräsentativ.

In der anschließenden Biopsie nach 3 Stunden wurden nach entsprechenden Umrechnungen 8,1 x 10^3 Leukozyten/µl im FNAB-Punktat und 10,1 x 10^3 Leukozyten/µl im Blut bestimmt.

In beiden Fällen waren bei der mikroskopischen Differenzierung der Leukozyten nur wenige Endothelzellen und keine Tubuluszellen zu erkennen. Bereits vor mikroskopischer Differenzierung konnte also durch die Coulter Counter Bestimmungen die Aussage getroffen werden, daß renale Gefäße punktiert wurden und die FNAB somit nicht repräsentativ ist. Bewiesen wurde diese Aussage schließlich durch die Ergebnisse der mikroskopischen Zählung der Parenchymzellen.

(b) Nähere Untersuchung einzelner Leukozytenpopulationen im Transplantat unter ALG-Immunsuppression:

Der Beginn und Verlauf der Abstoßungsreaktionen unter ALG-Therapie stehender Tiere wurde bis zu den Incrementbestimmungen in kurzen Intervallen am 7. Tag (Versuchsgruppe 3) mit der Coulter Counter modifi-

zierten FNAB beobachtet. Ergebnisse dieser Untersuchungen erweitern die bereits in 5.1 (d) beschriebenen Beobachtungen der ALG-Wirkungen in allogenen Hunde-Nierentransplantaten (Ergebnisse der Versuchsgruppe 2).

Das absolute Leukozytenincrement (aIK) als Differenz der Gesamtzahl der Leukozyten des Transplantats und der Peripherie (Abb. 13) zeigt während des Beobachtungszeitraums zwischen dem 3. und 6. p. op. Tag eine starke in-situ-Invasion von 6,5 x 10^3 Leukozyten/ul auf 27,1 x 10^3 Leukozyten/ul. Dieses Verhalten der Gesamtleukozyten entspricht einer Erhöhung des Inflammationsfaktors (IF) von 1,2 am 2. auf 2,7 am 6. und 7. p. op. Tag (Abb. 13).

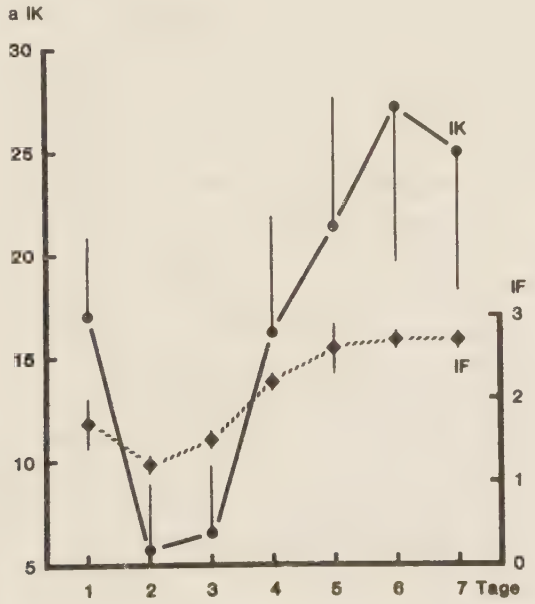


Abb. 13: Entwicklung des absoluten Leukozytenincrements (aIK) und des Inflammationsfaktors (IF) in zwei mit ALG behandelten Hundenieren-Allotransplantaten bis zum Zeitpunkt der Intervallbiopsien (Versuchsgruppe 6).

Die Betrachtung absoluter Incrementberechnungen veranschaulicht deutlicher als das relative Increment das Ausmaß der zellulären Transplantatinflammation. Diese Erscheinung stellt sich besonders ausgeprägt zwischen dem 3. und 7. Tag bei den Lymphoblasten (Abb. 14a) und Lymphozyten (Abb. 14b), in geringerer Ausprägung aber auch bei Plasmablasten und Plasmazellen (Abb. 14c) sowie Monozyten (Abb. 14d) dar.

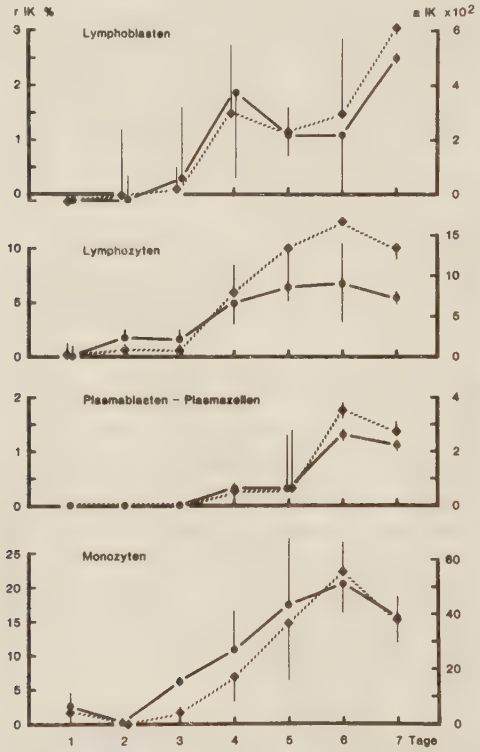


Abb. 14: Gegenüberstellung der Entwicklungen der relativen (rIK) und absoluten (aIK) Incremente einzelner Leukozytenpopulationen in zwei mit ALG behandelten Hundenieren-Allotransplantaten bis zum Tage der Intervallbiopsien (Versuchsgruppe 6)

Die Ergebnisse dieser Incremententwicklungen immunkompetenter Zellen stimmen mit denen der Versuchsgruppe 2 überein. Es zeigt sich aber, daß durch die Betrachtung des absoluten Increments einzelner Zellpopulationen Übergangsstadien von Abstoßungsreaktionen in ALG immunsupprimierten Tieren besser zu erkennen sind.

(c) Nähere Untersuchung zellulärer Veränderungen einzelner Leukozytenpopulationen im Transplantat nach einer einmaligen ALG-Gabe:

Während bisherige Untersuchungsergebnisse - dargestellt in 5.2 (d) - nur zeigten, wie sich das relative Increment einzelner Zellpopulationen nach einer ALG-Applikation verändert, sollte mit der Coulter Counter modifizierten Incrementberechnung die ALG-Wirkung auf die in-situ-Gesamtleukozyten näher analysiert werden.

Die absoluten Incremententwicklungen zeigen, daß eine ALG-Applikation nicht nur im Blut (Abb. 8a), sondern auch im Transplantat (Abb. 15a) eine Verminderung sämtlicher Leukozytenpopulationen hervorruft. Diese Leukopenie setzt unmittelbar nach ALG-Gabe ein. Sie ist besonders ausgeprägt zwischen der 4. und 8. Stunde und hält 13 bis 14 Stunden an (Abb. 15a).

Das absolute Leukozytenincrement (Abb. 15b) hingegen läßt während der ersten 2 Stunden nach Gabe des Antiserums nur eine langsam einsetzende Abnahme erkennen. Diese Verzögerung erklärt sich aus dem schneller einsetzenden intravasalen Abfall der Leukozyten. Auch der Anstieg des Inflammationsfaktors (Abb. 15c) innerhalb der ersten 2 Stunden nach ALG-Gabe stützt diesen Befund.

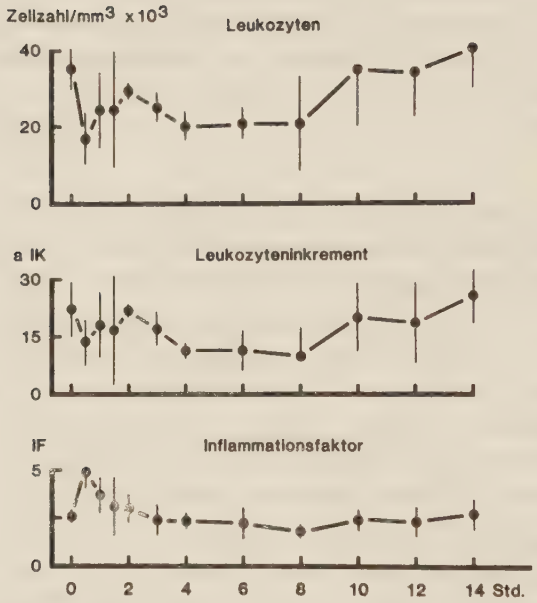


Abb. 15: Einfluß einer einmaligen ALG-Applikation nach allogener Hunde-Nierentransplantation auf: (a) die Gesamtleukozyten im Transplantat, (b) das absolute Leukozytenincrement (aIK), (c) den Inflammationsfaktor (IF).

Die Ergebnisse der absoluten Incremente der Lymphozyten, Monozyten, Lymphoblasten sowie Plasmablasten und Plasmazellen (Tab. 10) zeigen, daß antilymphozytäre Antikörper auf jede dieser Zellarten wirken. Da

Stunden	0	0,5	1	1,5	2	3	4	6
Lymphozyten (x 10^3/mm³)	1,5± 0,3	1,6± 0,6	1,7± 0,2	1,4± 0,4	1,2± 1,0	0,9± 0,8	0,5± 0,4	0,5- 0,5
Monozyten (x 10^3/mm³)	2,9± 1,3	2,9± 0,5	3,4± 0,7	2,6± 0,9	3,4± 0,8	1,9± 1,2	1,3± 0,9	1,3- 0,7
Lymphoblasten (x 10^2/mm³)	3,6± 2,9	4,6± 3,1	4,7± 1,9	3,0± 2,1	2,4± 1,9	1,5± 1,5	1,2± 1,0	0,9- 1,0
Plasmablasten und -zellen (x 10^2/mm³)	2,7± 1,7	1,9± 1,0	1,8± 0,7	2,5± 1,8	2,2± 2,6	1,5± 1,5	1,1± 0,9	1,1- 1,1
Segmentkernige (x 10^3/mm³)	-5,5± 2,1	-4,3± 0,8	-4,1± 1,2	-2,8± 1,5	-3,1± 1,4	-2,2± 0,7	-2,2± 1,0	-1,7- 1,0
Stabkernige (x 10^2/mm³)	-5,8± 4,0	-10,5± 6,0	-21,3± 7,7	-24,2±15,0	-18,1± 8,7	-5,8±16,6	-0,9± 5,5	-2,2- 4,5
Eosinophile (x 10^2/mm³)	-0,9± 0,3	-0,5± 0,2	-0,7± 1,1	-1,0± 1,6	-2,0± 3,7	-0,9± 1,5	-0,7± 1,2	0,0- 0,6

Stunden	8	10	12	14
Lymphozyten (x 10^3/mm³)	0,4± 0,3	0,9± 0,6	0,9± 0,4	1,2± 0,5
Monozyten (x 10^3/mm³)	2,2± 0,6	3,4± 0,9	3,4± 1,2	4,9± 1,9
Lymphoblasten (x 10^2/mm³)	0,5± 0,8	2,2± 2,2	1,9± 1,4	2,3± 1,3
Plasmablasten und -zellen (x 10^2/mm³)	0,9± 1,0	1,8± 1,8	2,2± 2,3	3,8± 2,3
Segmentkernige (x 10^3/mm³)	-1,5± 0,8	-4,3± 0,9	-4,7± 1,9	-6,1± 2,2
Stabkernige (x 10^2/mm³)	-4,5± 5.8	-10,7± 7,0	-10,2±12,3	-9,4± 7,1
Eosinophile (x 10^2/mm³)	-0,2± 0,9	-0,6± 1,8	-1,3± 3,5	-0,3± 2,5

Tab. 10 : Veränderungen der absoluten Incrementwerte einzelner Zellspezifitäten nach einer ALG-Applikation.

die zellulären Incremente jedoch durch die gleichzeitig erfolgenden Veränderungen einzelner Zellpopulationen im Blut mitbeeinflußt werden, ermöglicht erst die gesonderte Betrachtung der Verteilung einzelner Zelltypen direkt im Transplantat eine zuverlässige Aussage über die in-situ-Wirkungen des ALG. Erst hier zeigt sich (Tab. 11), daß im Rahmen der generalisierten Leukopenie insbesondere die Zahl der in-situ-Lymphozyten nach 4 Stunden signifikant ($p < 0{,}001$) abgenommen hat. Auch die Lymphoblasten sind unter ALG-Wirkung vermindert. 14 Stunden nach der Applikation antilymphozytärer Antikörper haben weder Lymphozyten noch Lymphoblasten ihre Ausgangshöhen wieder erreicht. Die übrigen Zellpopulationen hingegen kompensieren verschieden schnell wieder ihre Ausgangswerte. Monozyten, Plasmablasten und Plasmazellen, segmentkernige und stabkernige Granulozyten überschreiten sogar präapplikative Werte (Tab. 11).

(d) Orientierende Untersuchungen bei menschlichen Allotransplantatempfängern zur diagnostischen Aussagekraft:

Orientierende Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, welche Aussagekraft die modifizierte Incrementberechnung bei menschlichen Allotransplantatempfängern hat. Es wurden die Diagnosen der Transplantatinflammationen, die sich aus der bisherigen und modifizierten Anwendung der Incrementbestimmung ergaben, miteinander verglichen. Bei beiden Anwendungsmöglichkeiten wurden weiter die Ergebnisse der Mittelwerte der prozentualen Leukozytendifferenzierung aus Biopsieaspirat und Blut verglichen. Es wurde auch untersucht, ob die alleinige Betrachtung der mit

Stunden	0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8
Lymphozyten (x 10^3/mm³)	3,6± 0,6	2,2± 0,6	2,5± 0,2	2,2± 0,5	2,2± 0,6	1,5± 1,2	1,2± 0,7	1,3± 1,2	1,3± 0,7
Monozyten (x 10^3/mm³)	9,2± 2,0	4,5± 0,7	5,7± 0,5	5,3± 0,7	7,1± 1,0	4,4± 1,3	4,5± 2,0	4,4± 1,6	5,1± 1,3
Lymphoblasten (x 10^2/mm³)	7,5± 4,3	6,3± 3,9	6,9± 2,4	4,7± 2,7	3,3± 2,6	2,3± 2,3	2,4± 2,0	2,1± 2,3	1,9± 1,9
Plasmablasten und -zellen (x 10^2/mm³)	4,7± 2,8	2,4± 1,3	2,5± 0,9	3,9± 2,7	3,8± 4,4	2,8± 1,7	2,0± 2,6	2,3± 2,0	2,1± 2,5
Segmentkernige (x 10^3/mm³)	19,1± 4,3	8,1± 2,1	12,5± 0,6	13,5± 1,0	18,2± 3,8	16,9± 2,7	12,2± 3,3	12,4± 2,4	12,0± 2,1
Stabkernige (x 10^3/mm³)	1,9± 1,1	1,1± 0,6	2,4± 0,1	2,0± 0,4	2,2± 1,4	2,0± 0,9	1,6± 0,7	1,6± 0,5	1,6± 0,3
Eosinophile (x 10^2/mm³)	4,3± 4,6	1,5± 1,5	2,0± 0,7	1,5± 0,7	1,8± 2,6	1,8± 2,5	1,2± 1,4	1,9± 0,8	1,5± 0,8
Makrophagen (x 10^2/mm³)	4,3± 5,7	2,2± 2,2	3,7± 1,4	3,7± 3,2	4,4± 3,8	2,3± 2,3	2,0± 1,6	2,5± 1,8	2,3± 1,8

Stunden	10	11	12
Lymphozyten (x 10^3/mm³)	2,5± 1,3	2,7± 1,2	3,4± 1,2
Monozyten (x 10^3/mm³)	10,5± 2,9	10,0± 3,3	11,9± 3,2
Lymphoblasten (x 10^2/mm³)	4,9± 3,4	4,4± 2,7	4,4± 4,7
Plasmablasten und -zellen (x 10^2/mm³)	3,1± 3,1	4,1± 4,4	6,4± 3,9
Segmentkernige (x 10^3/mm³)	17,5± 3,9	16,8± 5,0	19,5± 4,6
Stabkernige (x 10^3/mm³)	2,6± 1,3	2,8± 0,9	3,3± 1,2
Eosinophile (x 10^2/mm³)	2,8± 2,7	3,4± 5,1	4,4± 5,9
Makrophagen (x 10^2/mm³)	3,5± 3,1	4,1± 3,0	4,0± 4,7

Tab. 11: Veränderungen der absoluten Verteilungen einzelner Leukozytenspezifitäten im Transplantat nach einer ALG-Applikation.

Coulter Counter bestimmten Ergebnisse der Leukozytenzahlen Rückschlüsse auf Transplantatabstoßungsreaktionen zuließen. Schließlich erfolgte ein Vergleich mit den vor der FNAB unbekannten klinischen Verläufen und Befunden.

1. Patient C. T.:

Nach Zytozentrifugation der verdünnten Blutsuspension zeigt sich eine Erhöhung der prozentualen Anteile der Lymphozyten und Lymphoblasten und - in geringerem Ausmaß - der segmentkernigen Granulozyten; stabkernige und eosinophile Granulozyten nehmen ab. Der Basophilenanteil ist unverändert (Tab. 12). Die zellulären Increments verändern sich entsprechend (Tab. 12).

Die Coulter Counter Berechnungen ergaben nach Angleichung der Erythrozytenkoeffizienten auf 4,3 x $10^6/\mu l$ im Blut Leukozytenwerte von 18,5 x $10^3/\mu l$. Im Aspirat errechnete sich - unter Berücksichtigung der Verdünnungen und der Zahl der Parenchymzellen - ein Leukozytenanteil von 18,4 x $10^3/\mu l$.

Bei diesem Patienten lassen die Leukozytenverteilungen und der daraus resultierende Inflammationsfaktor von 1,0 die FNAB-Bewertungen zu:

a) eine Abstoßungsreaktion ist nicht zu erkennen, oder
b) es wurde - bei mikroskopischem Nachweis nur weniger oder keiner Parenchymzellen - ein kleines Nierengefäß mitpunktiert.

Die Absolutverteilungen der Lymphozyten, Monozyten, Lymphoblasten sowie der Plasmablasten und Plasmazellen in Korrelation zu ihren prozentualen Anteilen (Abb. 16) zeigen eine geringe lymphozytäre und monozytäre in-situ-Infiltration.

	Lybl	Pbl+ Pc	Ly	Seg	Stab	Eos	Baso	Mo	Tz
A	0,3±0,6	0,3±0,6	3,3±0,6	91,3±0,6	1,3±0,6	2,3±0,6	0	1,7±0,6	19
B1	0	0	2,0±0,0	83,3±3,1	4,0±1,0	8,3±1,0	0,7±0,6	1,7±0,6	
B2	0,7±0,6	0	2,7±0,6	90,3±1,5	2,7±1,5	2,7±0,6	0,7±0,6	1,0±1,0	
I1	0,3±0,6	0,3±0,6	1,3±0,5	8,0±3,0	-2,7±1,5	-6,0±2,0	-0,7±0,6	0,0±1,0	
I2	-0,3±0,6	0,3-0,6	0,7±1,2	1,0±2,0	-1,4±1,2	-0,3±0,6	-0,7±0,6	0,7±0,6	

A_{abs}	56±111	56±111	611±111					315±111
B_{abs}	129±110	0	497±110					184±184

Tab. 12 : Pat. C. T.: Veränderungen der Ergebnisse prozentualer Zelldifferenzierungen sowie der daraus resultierenden Incrementwerte nach RBC-Koeffizientenangleichung und Darstellung absoluter Anteile einzelner Zellspezifitäten.
(A: Biopsie, B: Blut, I: Increment, 1: vor RBC-Koeffizientenangleichung, 2: nach RBC-Koeffizientenangleichung, A_{abs}: Absolutwerte einzelner Zellpopulationen in Biopsie, B_{abs}: Absolutwerte einzelner Zellpopulationen im Blut, Lybl: Lymphoblasten, Pbl+ Pc: Plasmablasten und Plasmazellen, Ly: Lymphozyten, Seg: Segmentkernige, Stab: Stabkernige, Eos: Eosinophile, Baso: Basophile, Mo: Monozyten, Mak: Makrophagen, Tz: Tubuluszellen).

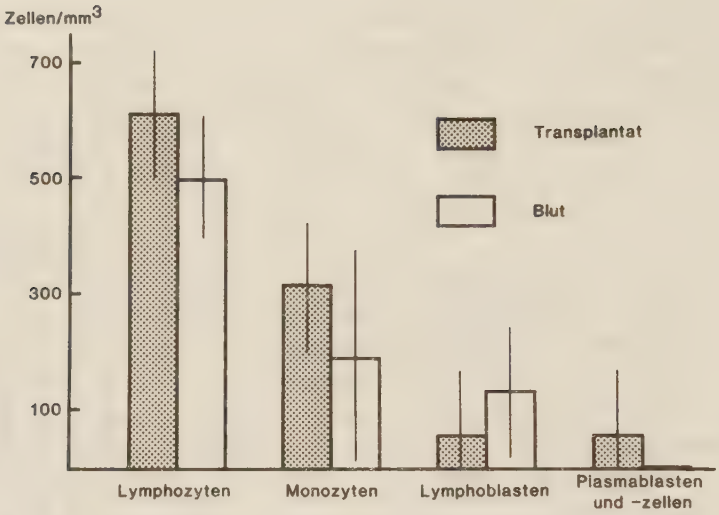


Abb. 16: Absolute Verteilungen von Lymphozyten, Monozyten, Plasmablasten und -zellen sowie Lymphoblasten im Transplantat und Blut beim Pat. C. T.
(Die sich darstellenden Säulenunterschiede zeigen das entsprechende absolute Increment.)

Beide Berechnungsmöglichkeiten des Increments zeigen also keine bzw. nur eine geringe mononukleäre Incrementerhöhung. Die Tubuluszellen hingegen waren mittel- bis hochgradig geschwollen und großteils vakuolisiert.

Die Parenchymzellmorphologie mit unauffälligem mononukleärem Begleitbild führt zur Beurteilung einer akuten Tubulusnekrose.

Der klinische Befund zum Zeitpunkt der FNAB zeigte einzig Anurie mit einem Serumkreatinin von 7,4 mg/100 ml am 6. p. op. Tag.

Einige Tage nach dem hier dargestellten TAC-Ergebnis kam es im klinischen Verlauf zu Polyurie und Kreatininabfall ohne immunsuppressive Therapie mit konsekutiv guter Transplantatfunktion. Die ATN wurde also bestätigt.

2. Patient C. L.

Die Angleichung der Erythrozytenkoeffizienten im Biopsieaspirat führt nach Zytozentrifugation bei der prozentualen Zelldifferenzierung zu einer ausgeprägten Erhöhung der Lymphozyten und zur Präsenz der Lymphoblasten; gleichzeitig nehmen die übrigen Zellspezifitäten ab (Tab. 13).

Die Gleichsetzung der Erythrozytenanteile in beiden Suspensionen auf 5,0 x 10^6/µl ergibt nach entsprechenden Umrechnungen infolge Verdünnungen und Zahl der Parenchymzellen bei der Coulter Counter Zählung im Aspirat 15,1 x 10^3 Leukozyten/µl und im Blut 10,1 x 10^3 Leukozyten/µl. Aus diesem Leukozytenverhältnis resultiert ein Inflammationsfaktor von 1,5.

In Korrelation zu ihren prozentualen Anteilen lassen die Absolutverteilungen der Lymphozyten, Monozyten und Lymphoblasten (Abb. 17) insbesondere eine lymphozytäre Inflammation bei begleitender Invasion der Monozyten und Lymphoblasten erkennen.

Während die bisherige Incrementbestimmung infolge des Lymphozytenwertes von 5,7% und des Monoytenincrements von 8% ohne begleitende Blasteninflammation nicht die Beurteilung einer Abstoßungsreaktion zuläßt, zeigt die modifizierte Anwendung hingegen durch ein erhöhtes Lymhozytenincrement von 15,7% und Lymphoblastenpräsenz Indizien einer beginnenden Abstoßungsreaktion. Dieser Befund wird durch die Erhöhung des Inflammationsfaktors und die Erhöhungen der absoluten Lymphozyten- und Monozytenincremente gestützt.

	Lybl	Pbl+ Pc	Ly	Seg	Stab	Eos	Baso	Mo	Tz
B	0	0	1,3±0,6	71,3±4,7	20,0±2,0	5,3±2,1	0,7±0,6	1,3±1,1	.
A1	0	0	7,0±1,0	63,7±4,7	15,3±0,6	4,3±2,1	0	9,3±2,3	21 .
A2	1,0±0,0	0	17,0±2,1	61,0±4,6	10,3±2,1	1,7±2,1	0	6,7±1,5	16 .
I1	0	0	5,7±1,5	-7,6±2,0	-4,7±1,7	-1,0±3,6	-0,7±0,6	8,0±3,0	
I2	1,0±0,0	0	15,7±2,3	-10,3±5,1	-9,7±3,2	-3,6±3,2	-0,7±0,6	5,4±1,5	

A_{abs}	151±0,0	0	2567±317					1012±227
B_{abs}	0	0	132±61					132±111

Tab. 13: Pat. C. L.: Veränderungen der Ergebnisse prozentualer Zelldifferenzierungen sowie der daraus resultierenden Incrementwerte nach RBC-Koeffizientenangleichung und Darstellung absoluter Anteile einzelner Zellspezifitäten. (Legende siehe Tab. 12).

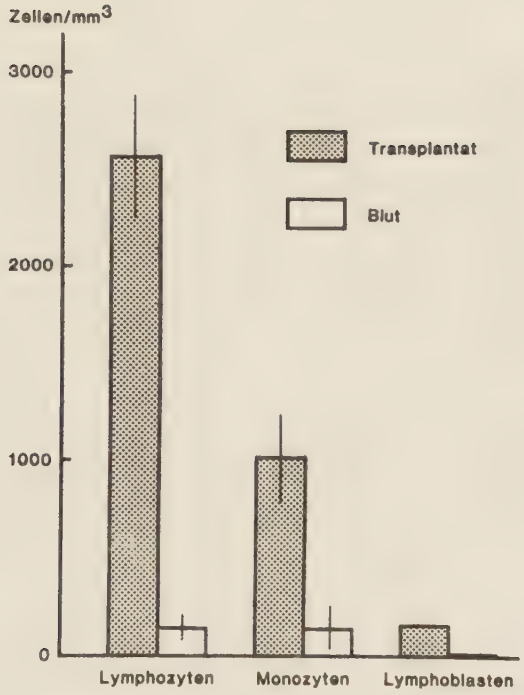


Abb. 17: Absolute Verteilungen von Lymphozyten, Monozyten und Lymphoblasten im Transplantat und Blut beim Pat. C. L.
(Die sich darstellenden Säulenunterschiede zeigen das entsprechende absolute Increment.)

Auch die später mitgeteilte klinische Symptomatik Erhöhung der renalen Retentionsparameter, leichte Gewichtszunahme, beginnende Diuresabnahme, Muskelschmerzen und Fieber korrelierten mit einer beginnenden Abstoßungsreaktion.

Der Patient entwickelte schließlich klinisch auch eine Abstoßungsreaktion, die auf Immunsuppression ansprach.

3. Patient H. J.:

Auch in diesem Fall zeigt sich nach Aspiratverdünnung bei Zytozentrifugation und prozentualer Differenzierung eine Erhöhung des Lymphozytenanteils in der TAC. Die prozentualen Verteilungen der lymphozytären Reifungsformen, stabkernigen und basophilen Granulozyten sind unverändert. Monozyten, segmentkernige und eosinophile Granulozyten nehmen entsprechend ab (Tab. 14).

Nach Erythrozytenangleichung auf 4,6 x $10^6/\mu l$ in beiden Suspensionen ergaben die Coulter Counter Berechnungen - unter Berücksichtigung der Verdünnungen und Parenchymzellanteile - Leukozytenwerte im Aspirat von 27,1 x $10^3/\mu l$, im Blut von 12,6 x $10^3/\mu l$. Der Inflammationsfaktor berechnet sich demgemäß mit 2,2.

Die Absolutverteilungen einzelner Zellarten gemäß ihrer Prozentanteile (Abb. 18) lassen eine ausgeprägte lymphozytäre und monozytäre Inflammation, die weiter von einer Erhöhung der Blasten begleitet ist, erkennen. Die relative Incrementberechnung zeigt eine Lymphoblasteninflammation von 1,0 und eine Infiltration der Plasmablasten und Plasmazellen von ebenfalls 1,0. Die absoluten Incrementwerte der Lymphoblasten von 320/μl sowie der Plasmablasten und Plasmazellen von 270/μl hingegen weisen auf eine Abstoßungsreaktion hin.

Die Bewertung der Incrementergebnisse beider Berechnungsmöglichkeiten führen zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion Grad 1.

	Lybl	Pbl+ Pc	Ly	Seg	Stab	Eos	Baso	Mo	Tz
B	0,3±0,6	0	4,7±0,6	69,7±3,2	4,0±1,7	10,3±2,1	0,7±1,2	10,7-2,3	
A1	1,0±1,0	1,0±0,0	17,3±1,2	45,0±1,1	4,3±1,5	7,7±2,0	2,0±0,0	20,7-2,9	
A2	1,3±0,6	1,0±0,0	35,0±2,6	38,0±1,7	4,7±2,5	4,3±0,6	2,3±0,6	14,6-1,2	43
I1	0,7±0,5	1,0±0,0	12,6±2,3	-24,7±2,3	-0,3±1,2	-2,6±1,3	1,3±1,2	10,0±2,6	
I2	1,0±0,0	1,0±0,0	30,3±3,2	-31,7±2,5	0,7±4,2	-6,0±1,7	1,7±1,5	3,5±1,5	
A_{abs}	352±163	271±0,0	9485±705					3957±325	
B_{abs}	38± 76	0	592± 76					1348±290	

Tab. 14: Pat. H. J.: Veränderungen der Ergebnisse prozentualer Zelldifferenzierungen sowie der daraus resultierenden Incrementwerte nach RBC-Koeffizientenangleichung und Darstellung absoluter Anteile einzelner Zellspezifitäten. (Legende siehe Tab. 12).

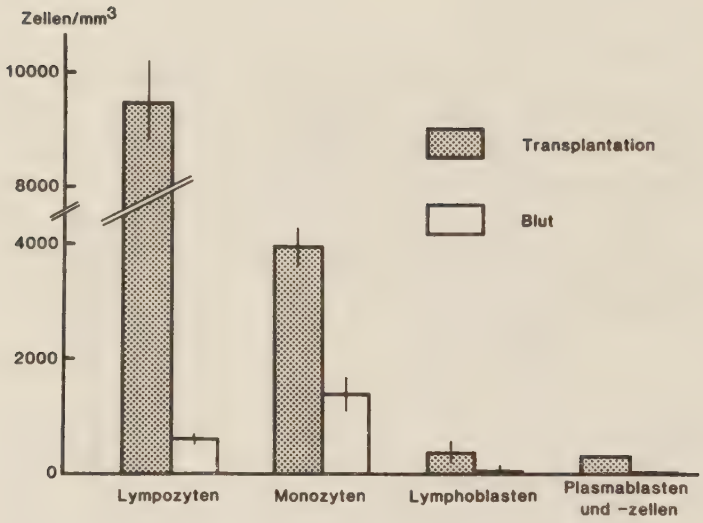


Abb. 18: Absolute Verteilungen von Lymphozyten, Monozyten, Plasmablasten und -zellen sowie Lymphoblasten im Transplantat und Blut beim Pat. H. J.
(Die sich darstellenden Säulenunterschiede zeigen das entsprechende absolute Increment.)

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse weiterer klinischer Untersuchungen wurde zum Zeitpunkt der FNAB die Diagnose einer beginnenden Abstoßungsreaktion bei immunsuppressiver Therapie gestellt.

Auch in der klinischen Epikrise kam es immer wieder zu rezidivierenden immunologischen Transplantatreaktionen, die nur schwer unter massiver immunsuppressi-

ver Behandlung kontrolliert werden konnten.

4. Patient R. E.:

Nach Zytozentrifugation der verdünnten Aspiratsuspension zeigt sich eine Erhöhung des prozentualen Anteiles der Lymphozyten in der TAC (Tab. 15). Lymphoblasten, Segmentkernige und Monozyten sind vermindert nachweisbar; die Anteile der übrigen Zellarten sind unverändert (Tab. 15).

Nach entsprechenden Umrechnungen ergaben die Coulter Counter Berechnungen infolge der Gleichsetzung des erythrozytären Hintergrundes auf 5,1 x 10^6 Erythrozyten/µl im Aspirat 21,0 x 10^3 Leukozyten/µl und 3,8 x 10^3 Leukozyten/µl im Blut. Aus diesem Leukozytenverhältnis errechnet sich ein Inflammationsfaktor von 5,5.

Die Absolutverteilungen der Lymphozyten und Monozyten (Abb. 19) lassen eine massive zelluläre Transplantatinflammation erkennen. Auch die Absolutverteilungen der Lymphoblasten, Plasmablasten und Plasmazellen sowie der Makrophagen weisen auf eine ausgeprägte mononukleäre in-situ-Infiltration hin.

Die Beurteilungen der Ergebnisse beider Increment-Berechnungsmöglichkeiten unterscheiden sich deshalb, weil das Ergebnis der bisherigen, nicht Coulter Counter modifizierten Incrementbestimmung ein spätes Stadium einer Abstoßungsreaktion Grad 1 anzeigt. Die Berücksichtigung weiterer Parameter, insbesondere des Inflammationsfaktors 5,5, der - bei Betrachtung der erhöhten absoluten Zellzahlen - von einer ausgeprägten mononukleären in-situ-Infiltration begleitet ist, führt zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion Grad 2.

	Lybl	Pbl+ Pc	Ly	Seg	Stab	Eos	Baso	Mo	Mak	Tz
B	0	0	8,0±1,0	83,0±3,0	4,7±1,0	1,7±0,6	0	3,3±0,6		
A1	0,7±0,6	0,7±0,6	28,7±3,1	52,7±2,5	2,3±1,2	2,3±1,5	1,0±0,0	11,0±2,6	2,3±0,6	
A2	0,3±0,6	0,7±0,6	40,7±0,6	46,3±2,3	1,0±0,0	3,3±0,6	1,0±1,0	7,0±0,0	2,3±0,6	32
I1	0,7±0,6	0,7±0,6	20,7±2,1	-30,3±2,1	-1,4±0,6	0,6±1,5	1,0±0,0	7,7±1,7		
I2	0,3±0,6	0,7±0,6	32,7±0,6	-38,3±3,8	-3,7±1,0	1,7±0,6	1,0±1,0	3,7±0,6		

A_{abs}	63±126	147±126	8547±126					1470±0,0	483±126
B_{abs}	0	0	304± 38					125± 23	

Tab. 15: Pat R. E.: Veränderungen der Ergebnisse prozentualer Zelldifferenzierungen sowie der daraus resultierenden Incrementwerte nach RBC-Koeffizientenangleichung und Darstellung absoluter Anteile einzelner Zellspezifitäten.
(Legende siehe Tab. 12).

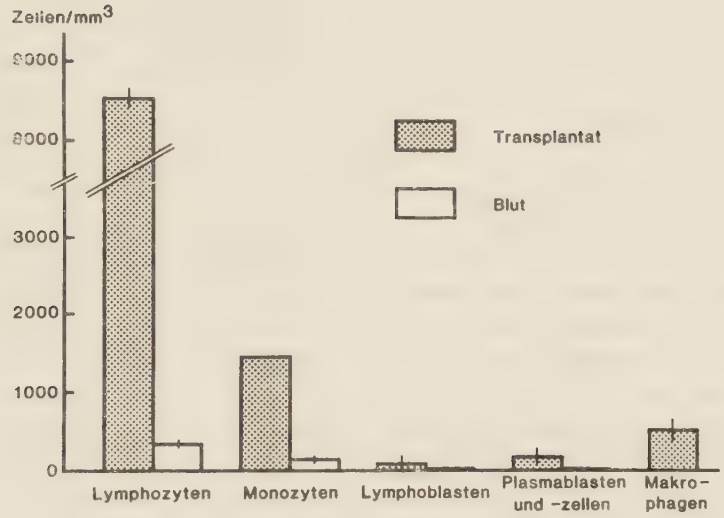


Abb. 19: Absolute Verteilungen von Lymphozyten, Monozyten, Plasmablasten und -zellen, Lymphoblasten sowie Makrophagen beim Pat. R. E.
(Die sich darstellenden Säulenunterschiede zeigen das entsprechende absolute Increment.)

Im klinischen Befund zeigten sich jedoch keine Symptome einer Abstoßungsreaktion. Ein lang anhaltendes, unverändert hohes Serumkreatinin lenkte den Verdacht eher auf eine akute Tubulusnekrose.

Die klinische Epikrise endete mit dem Verlust des Transplantats in der 6. p. op. Woche, 8 Tage nach dem hier dargestellten TAC-Ergebnis. Bei der Explantation fand sich eine vollständige Parenchymnekrose des Transplantats.

6. DISKUSSION:

6.1 Allgemeines:

(a) Verwendete Tiere:

Bastardhunde schienen für die beschriebenen Untersuchungen geeignete Empfängertiere zu sein, weil sie folgende Vorteile besaßen:

1. Die DLA-Antigene von Bastardhunden sind heterogener ausgeprägt als die innerhalb einer gleichen Hunderasse, wie beispielsweise Beagles. Durch diese DLA-Heterogenität konnte davon ausgegangen werden, daß die Transplantate in genetisch nicht verwandte Empfängertiere implantiert wurden (9, 156).
2. Desweiteren ähnelt diese Verteilung der Antigene der Situation beim Menschen. Dies erlaubt, die sich darstellenden Ergebnisse auf klinische Studien zu übertragen (156, 172).
3. Bereits vorliegende Untersuchungen über allogene Hunde-Nierentransplantationen mit und ohne ALG-Immunsuppression erleichtern die Beurteilung der Ergebnisse (32, 123, 132).

(b) Transplantatfunktionszeiten:

Durch die Beendigungen der Versuche der Gruppen 1 und 2 bei einem bestimmten renalen Retentionsparameter (158) wird der Begriff der Überlebenszeit durch den Terminus der Transplantatfunktionszeit ersetzt. Auch stellte sich am Ende der Beobachtungszeiten in keinem Fall eine vollständige Anurie ein.

Der immunsuppressive Einfluß des ALG bei Tieren ist allgemein anerkannt (4, 81). Es konnte auch bewiesen werden, daß ALG die Überlebenszeiten renaler Allotransplantate sowohl beim Hund (1, 125, 143) als auch in der Ratte (55) signifikant verlängert. Aus diesem Grunde zielten diese Untersuchungen nicht auf das Erreichen möglichst langer, bereits beschriebener Überlebenszeiten. Es sollte vielmehr durch die Applikation eines ALG niedrigeren Lymphozytotoxizitätstiters versucht werden, auch gering ausgeprägte Veränderungen einzelner Zellpopulationen nicht nur im Blut, sondern - erstmals - auch direkt in allogenen Hunde-Nierentransplantaten zu beobachten.

Zwar ist die Wirkung antilymphozytärer Antikörper bei Zytotoxizitätstitern zwischen 1:1024 bis 1:2048 stärker (75, 89, 117, 123), so ließ doch das applizierte ALG mit einem Titer von 1:256 eine in-vivo-Aktivität erkennen. Diese in-vivo-Wirkung zeigte sich insbesondere an der sich einstellenden Lymphopenie (152) und der signifikanten Erhöhung der Transplantatfunktionszeiten im Vergleich zu denen unbehandelter Kontrolltiere. Die Dauer der Transplantatfunktionen koinzidierte mit den entsprechenden, bereits beschriebenen Überlebenszeiten anderer Studien (25, 35, 56, 145, 172). Hätte man potenteres ALG verwendet, wären die Feinheiten der einzelnen durch die Antikörper ausgelösten Reaktionen nicht zu beobachten gewesen.

6. 2 FNAB-Methode:

(a) Nebenwirkungen der FNAB:

Nur am Beginn der Untersuchungen kam es zu Ver-

lusten von 3 Hunde-Nierentransplantaten, die sich klinisch durch Makrohämaturie mit konsekutiver Oligurie bis Anurie ankündigten und therapierefraktär waren. Auch Punktionen humaner Nierentransplantate zeigten in äußerst geringer Zahl postbioptische Makrohämaturien, die jedoch nur wenige Stunden anhielten (62, 121, 159). In keinem Fall trat ein Transplantatverlust auf.

Wie beim Menschen (61, 62) muß also auch beim Hund auf die Punktion des Cortex renalis geachtet werden. Ist eine solche Punktion nicht sicher zu gewährleisten, so kann sie - wie auch als Methode der Wahl bei renalen Stanzbiopsien beschrieben (141) - unter sonographischer Kontrolle erfolgen.

Obwohl die FNAB beim Hund nur unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt werden konnte, führte die tägliche Punktion in keinem Fall zu einer klinisch und/oder pathologisch-histologisch apparenten Infektion.

Wie beim Menschen kann die FNAB sogar bei wiederholter Anwendung als komplikationslos angesehen werden (61, 63, 67).

(b) Zuverlässigkeit der FNAB:

Die Zuverlässigkeit des Erkennens von Abstoßungsreaktionen mittels FNAB und TAC wird unterschiedlich beurteilt.

Nach Explantationen 5 abgestoßener Transplantate konnte durch den Vergleich einzelner FNAB-Incrementergebnisse mit den nach Kollagenase-DNAse gewonnenen Dispersaten derselben Transplantate eine hohe Zuver-

lässigkeit in der diagnostischen Wertigkeit der FNAB gezeigt werden (159).

In anderen Untersuchungen korrelierten auch die zytologischen Ergebnisse mit den histologischen Beurteilungen ausgeführter Stanzbiopsien in 75% (67) bis 79% (26) der Fälle.

Es wird aber auch berichtet, daß eine durch FNAB diagnostizierte Hyperzellularität eine entsprechende klinische immunsuppressive Therapie nicht unmittelbar indiziert (26). Diese eingeschränkte klinische Relevanz ist dadurch begründet, daß die Incremente in-situ-inflammatorischer Zellelemente zum einen nicht immer eine herabgesetzte Transplantatfunktion oder klinische Zeichen einer Abstoßungsreaktion repräsentieren, sondern sich zum anderen auch ohne immunsuppressive Therapie wieder spontan zurückbilden können.

Humorale oder chronisch vaskuläre Abstoßungsreaktionen sind durch die TAC nicht zu erfassen (26, 67).

Die FNAB und TAC besitzen zur Analyse der in-situ-Wirkungen antilymphozytärer Antikörper eine methodisch ausreichende Zuverlässigkeit. Dies deshalb, weil

1. weder humorale noch vaskuläre Abstoßungsreaktionen nach Hundenieren-Allotransplantationen auftraten, und
2. nach Ausschluß des Beginns von Abstoßungsreaktionen infolge Hundenieren-Autotransplantationen sich auch feinnadelbioptisch keine Hinweise auf immunologisch bedingte Transplantatinflammationen ergaben.

Die Methode der FNAB ist somit zur Untersuchung und Analyse der in-situ-Wirkungen des ALG geeignet.

(c) FNAB-Increment:

Während der Transplantatpunktion passiert die Biopsienadel mehrere inflammatorische Foci (61), aus denen inflammatorische und im Blut zirkulierende Zellelemente aspiriert werden. Es erscheint möglich, daß nach der Differenzbildung einzelner Leukozytenspezifitäten aus Transplantat und Blut das resultierende Increment den zytologischen Inflammationsgrad eines Transplantats widerspiegeln kann.

Umstritten hingegen erscheint die Einführung des Terminus des korrigierten Increments (61, 67). Hierbei werden die Differenzwerte einzelner Zellen durch Zuteilungen von Faktoren für Lymphozyten (0,1), Monozyten (0,2), Plasmablasten und Plasmazellen (1,0), Lymphoblasten (1,0) sowie Makrophagen (1,0) mit anschließender Summenbildung der daraus sich ergebenden Zell-Einzelwerte korrigiert. Auf dem Workshop der FNAB 1982 (65) wurden diese Berechnungen durch die weitere Einführung von Multiplikatoren für sensibilisierte Lymphozyten (0,5) und Granulozyten (0,1) modifiziert. Bei dieser Multiplikatorenzuteilung verwundert insbesondere der Faktor für Granulozyten. Dies deshalb, weil gezeigt werden konnte, daß das Erscheinen dieser Zellpopulation im Punktionsaspirat im wesentlichen nur auf die Blutkontamination der FNAB zurückzuführen ist (160).

Obwohl auch Häyry diese Faktorenzuteilung als willkürlich (61) bezeichnet, sollen sie dennoch - wie retrospektiv Untersuchungen von 1000 Aspirationsbiopsien ergeben hätten - zuverlässig das Ausmaß der zellulären in-situ-Inflammation widerspiegeln (58).

In den hier dargestellten Untersuchungen der Analyse

der ALG-in-situ-Wirkungen blieb das korrigierte Increment unberücksichtigt, weil

1. die erwähnte retrospektive Analyse (58) nicht in der Lage ist, den willkürlichen Charakter dieser Multiplikatorenzuteilungen zu entkräften,
2. keine Untersuchungen vorliegen, die die Gewichtung der Faktoren einzelner Leukozytenpopulationen sinnvoll nachvollziehen lassen.

Diese Multiplikatoren führen also zur Einführung subjektiver Beurteilungsmaßstäbe und damit schließlich zur ungenauen bzw. nicht von jedem Untersucher nachvollziehbaren Bewertung des tatsächlich existenten zytologischen Inflammationsgrades eines Transplantats.

Die Incrementberechnung ohne Berücksichtigung der Multiplikatoren beinhaltet ausreichende Informationsmöglichkeiten über die zytologische in-situ-Situation während bestehender Abstoßungsreaktionen, insbesondere auch unter dem Einfluß massiver Immunsuppression.

Die Berechnungen der Incrementwerte sind nicht nur durch zelluläre Änderungen im Transplantat, sondern auch durch die im Blut beeinflußt. Die genaue Bewertung einer Transplantatinflammation, insbesondere unter dem Einfluß einer intravasal applizierten, immunsuppressiven Behandlung, setzt demgemäß voraus, daß die Fluktuationen einzelner Zellen sowohl in-situ als auch in der Peripherie untersucht werden. Auch in den dargestellten Versuchen konnten erst durch die zunächst gesonderte und dann gleichzeitige Betrachtung sowohl der zellulären in-situ-Verläufe als auch ihrer entsprechenden Incremente die Wirkungen antilymphozytärer Antikörper näher bestimmt werden.

(d) Modifikation der Incrementberechnung:

Der Einsatz eines Coulter Counters ermöglicht durch eine modifizierte Berechnung eine Verbesserung der Incrementbestimmung.

Bei der bisherigen Bestimmung geht man zur Berechnung des Increments von der Dichte des Pelets - vorgegeben durch die Zahl der Erythrozyten auf dem Objektträger nach Zytozentrifugation - aus.

Läßt man die Parenchymzellen der FNAB unberücksichtigt, so bestehen sowohl die Suspensionen des Aspirats (A) als auch des Bluts (B) aus Leukozyten (WBC) und Erythrozyten (RBC):

$$A = WBC_A + RBC_A$$

$$B = WBC_B + RBC_B$$

Die bisherige Probenverarbeitung beinhaltet somit den Fehler der Nichtübereinstimmung des erythrozytären Hintergrundes. Mit anderen Worten: Gemäß der genannten Gleichung errechnet sich durch fehlende Gleichsetzung der Erythrozytenkoeffizienten (RBC) ein ungenaues Increment.

Desweiteren gibt die prozentuale Bestimmung einzelner Leukozytenpopulationen nur unvollständig den tatsächlich immunologischen Zustand eines Transplantats wider. Dies deshalb, weil die Gesamtzahlen der Leukozyten im Aspirat und Blut unberücksichtigt bleiben.

Unterstellt, 2% Lymphozyten im Transplantat und 3% Lymphozyten im Blut werden bestimmt, so bestünde nach bisheriger Auffassung ein negatives Increment von -1%. Unter Berücksichtigung der Gesamtzahl der Leukozyten

- z. B. 8000 Leukozyten/µl im Transplantat und 2000 Leukozyten/µl im Blut - fände sich jedoch ein tatsächliches Increment von 100 Lymphozyten.

In progredienten bis irreversiblen Abstoßungsreaktionen berichtet Häyry (62) über relative Incrementwerte von <2% der Lymphoblasten, <3% der Plasmablasten und Plasmazellen, <7% der Lymphozyten, <6% der Monozyten und <10% der Makrophagen. Die Berücksichtigung der Gesamtzahl der Leukozyten beinhaltetet nun den Vorteil, daß die doch geringen Incrementwerte inflammatorischer Zellelemente selbst bei progredienten bis irreversiblen Abstoßungsreaktionen in einer anderen Dimension erschienen: Jetzt spiegelten die Incremente tatsächlich den massiven leukozytären Transplantatinflux während bestehender Abstoßungsreaktionen wider.

Es muß aber auch betont werden, daß es sich bei der Coulter Counter modifizierten Incrementbestimmung nur um einen semiquantitativen Beurteilungsmaßstab immunologisch existenter Abstoßungsreaktionen handeln kann. Dies deshalb, weil während der jeweiligen Punktionen nicht immer genau dieselben Volumina aspiriert werden und somit die einzelnen TAC-Ergebnisse nur beschränkt miteinander vergleichbar sind. In diesem Zusammenhang darf keinesfalls unerwähnt bleiben, daß als genaueste Angabe der in-situ-Inflammation nur der Anteil inflammatorischer Zellelemente pro Gewichtseinheit Transplantatgewebe gelten kann. Ein solches Vorgehen ist aber - leider - für die praktische FNAB-Anwendung nicht möglich.

Trotz dieser Nachteile erscheint die Anwendung eines Coulter Counters zur Modifikation der Incrementberechnung geeignet. Entsprechende experimentelle und klinische Untersuchungen zeigten:

1. Durch die entsprechende Verdünnung einer Suspension mit anschließendem Einsatz konstanter Volumina in die Zytozentrifuge werden und bleiben die Erythrozytenkoeffizienten in der Aspirat- und Blutlösung gleichgesetzt. Das Increment kann also nach Fortfall des erythrozytären Hintergrundes genauer berechnet werden.
2. Die Coulter Counter Bestimmungen sowie die Berechnungen der zellulären Incremente und in-situ-Absolutwerte können das Ausmaß der leukozytären Transplantatinflammation deutlicher darstellen.
3. In fortgeschrittenen Stadien einer Abstoßungsreaktion beträgt - ausgedrückt durch den Inflammationsfaktor - die Zahl der im Aspirat suspendierten Leukozyten ein Vielfaches der im Blut befindlichen. Mit Progredienz der Abstoßungsreaktion nimmt der Inflammationsfaktor zu.
4. Vollausgebildete Stadien von Abstoßungsreaktionen werden sowohl durch die bisherige als auch durch die Coulter Counter modifizierte FNAB bzw. Incrementbestimmung sicher erkannt. Die FNAB Modifikation besitzt jedoch den wichtigen Vorteil, infolge der Gesamtbetrachtung und -wertung weiterer diagnostischer Parameter Übergangsstadien einzelner Grade von Abstoßungsreaktionen besser erkennen zu können.

6.3 Wirkungen antilymphozytärer Antikörper im Transplantat und Blut:

Bisher konnten die Einflüsse des ALG nur im peripheren Blut untersucht werden (Übersichtsarbeiten 36,

72, 80, 81, 106, 136, 165). Aus diesen Untersuchungen resultieren 6 Theorien möglicher Wirkungsmechanismen antilymphozytärer Antikörper:

(a) Hypothesen der peripheren ALG-Wirkung:

1. Umhüllungstheorie ("blindfolding"):

   ALG besetzt Oberflächenrezeptoren der Lymphozyten mit der Folge, daß diese Zellen nicht mehr das Antigen erkennen und mit ihm reagieren können (20, 69, 98, 166, 169). Die Rosetteninhibition der T-Lymphozyten bei Zugabe von Schaferythrozyten in vitro (18, 51, 74, 104, 170) impliziert die Möglichkeit des Besetzens der T-Zellrezeptoren durch das heterologe Immunglobulin (72). Der langanhaltende immunsuppressive Effekt des ALG kann alleine aber nicht mit dieser Hypothese erklärt werden (91, 98).

2. Hypothese des Enhancement:

   Antilymphozytäre Antikörper binden sich an Zellen des Transplantats (53, 54, 97, 146). Infolge der daraus resultierenden Zielorganmaskierung führt die vor Hauttransplantationen applizierte ALG-Therapie bei Spendertieren zu einer Reduktion der antigenen Erkennung und damit zu einer Erhöhung der Transplantatüberlebenszeit (52). Dieser Effekt konnte jedoch weder bei Verwendung anderer Transplantatgewebe noch nach Gabe bakterieller Antigene nachvollzogen werden (94), so daß diese Theorie in den Hintergrund rückte.

3. Hypothese der antigenen Kompetition:

   Die immunogene Wirkung antilymphozytärer Seren selbst führt zu einer Reaktionsumlenkung immunkom-

petenter Zellen (54, 94), so daß die Transplantatantigene vor immunologischen Erkennungs- und Destruktionsmechanismen geschützt sind. Mäuse, die mit Ratten-anti-Maus-Lymphozytenseren behandelt wurden, zeigten trotz erfolgter Toleranzentwicklung auf Injektionen von Gammaglobulinen der Ratte eine anhaltende Immunsuppression (77). Diese fehlenden immunologischen Reaktionen auf Fremdproteine schränken die Gültigkeit der Theorie der Reaktionsumlenkung immunkompetenter Zellen durch antilymphozytäre Antikörper (54, 94) ein.

4. Hypothese des Thymuseffekts:

   ALG-Injektionen bewirken eine Inaktivierung eines Thymusfaktors (115, 133), der für die Entwicklung einer bestimmten immunologisch kompetenten Zellspezifität, nämlich des T-Lymphozyten, verantwortlich ist (109). Es konnte aber auch gezeigt werden, daß weitere zur Herstellung von Antiseren verwandte lymphoide Antigene Verlängerungen von Transplantatüberlebenszeiten induzieren (164).

5. Hypothese der sterilen Aktivierung:

   Sowohl in vivo (39, 97, 98, 115) als auch in vitro (21, 80, 87, 166) fand sich eine durch ALG initiierte Lymphozytenproliferation. Diese gesteigerte lymphozytäre Transformation führt zu funktionsinhibierten Zellen, die nicht mehr mit dem Antigen reagieren können (98). Der Ersatz der Proliferation durch direkten Zelluntergang nach Komplementzugabe in vitro (168) schränkt die Gültigkeit dieser Theorie ein.

6. Hypothese der Lymphozytenzytotoxizität:

Antilymphozytäre Antikörper bewirken eine periphere Lymphopenie (6, 18, 45, 51, 80, 93, 108, 116, 165, 166) mit nachfolgend supprimierter Immunreaktivität (93, 97, 98, 113). Insbesondere rezirkulierende T-Lymphozyten, die für die Antigenerkennung mitverantwortlich sind (3, 27, 58, 96), werden vermindert (72, 84, 130). Die Mitwirkung des Komplementsystems an dieser zytotoxischen Reaktion wird unterschiedlich beurteilt (7, 48, 71, 129, 166). Auch die Ergebnisse über Untersuchungen des Eindringens antilymphozytärer Antikörper in das periphere lymphatische Gewebe differieren. Zum einen zeigte sich unter ALG-Einfluß eine Lymphozytenminderung sowohl in der parakortikalen (thymusabhängigen) Lymphozytenpulpa bei fehlenden Veränderungen germinativer (B-) Lymphknotenzentren als auch in periarteriolären (T-Lymphozyten enthaltenden) Milzarealen (93, 119, 154). Zum anderen konnten keine Veränderungen der Lymphozytenverteilungen in Lymphknoten und Milz festgestellt werden (38, 45, 84). Es wird angenommen, daß zytotoxisch geschädigte Lymphozyten vom retikuloendothelialen System der Leber, insbesondere von den Kupffer-Sternzellen, phagozytiert werden (45, 93).
Im Rahmen der zytotoxischen Beeinflussung der Lymphozyten inhibiert ALG stärker das zelluläre als das humorale Immunsystem (19, 72, 93, 111, 128, 166).

(b) ALG induzierte Blutveränderungen nach allogener Hunde-Nierentransplantation:

ALG bewirkt weder im allogenen noch autogenen System eine Minderung der peripheren Gesamtleukozyten (68, 143). Die in kurzen Intervallen durchgeführten Untersuchungen der Leukozyten beweisen jedoch, daß antilymphozytäre Antikörper jede Leukozytenspezifität innerhalb der ersten Stunde nach Applikation beeinflussen. Wegen der kurzen Halbwertzeit des ALG (5, 92) regenerieren sich die Gesamtleukozyten innerhalb von 12 Stunden. Die ausgeprägte Leukopenie ist also nur während eines begrenzten Zeitraums post injectionem zu beobachten.

Während der gesamten Beobachtungszeit zeigt sich eine signifikante Lymphozytenreduktion (19, 57, 66, 116, 124). Eine Abnahme der Lymphozytenzahl unter dem Einfluß antilymphozytärer Antikörper ist aber nicht nur nach allogener, sondern auch nach autologer Hunde-Nierentransplantation festzustellen. ALG bewirkt also in jedem Fall eine signifikante Lymphozytenreduktion, die nicht direkt abhängig von einem alloantigenen Stimulus ist.

Es ist denkbar, daß durch das Antiserum einzig das Verhältnis zirkulierender zu nicht-zirkulierender Lymphozyten beeinflußt wird. Nach Reduktion der ALG-Wirkung könnte durch das Wiedererscheinen rezirkulierender Lymphozyten, also von Zellen, die auch bereits vor Injektion intravasal zirkulierten, die Zellzahl normalisiert werden. Die forcierte, reaktive Erhöhung stabkerniger Granulozyten, die bereits 2 Stunden nach Serumapplikation ihren Ausgangswert anglichen und nachfolgend um ein Vielfaches überschritten, limitiert jedoch die Möglichkeit des

Ausgleichs der Lymphozytenverminderung durch Rezirkulation. Vielmehr werden zur Füllung dieses Defizits unreife Leukozytenvorläufer aus dem Knochenmark ausgeschwemmt. Hinzukommt, daß nach ALG-Applikation unmittelbar pathologische Alterationen der Zellmorphologie der Lymphozyten zu erkennen sind. Nach Schwellung, Vakuolisation und Kernpyknose kann innerhalb der ersten Stunde nach ALG-Injektion lichtmikroskopisch eine Vielzahl von Zelltrümmern lymphozytärer Herkunft nachgewiesen werden. Diese morphologischen Erscheinungen verbunden mit der extremen reaktiven leukozytären Linksverschiebung lassen eine zytotoxische Schädigung dieser peripheren Zellspezifität durch antilymphozytäre Antikörper vermuten (80, 165, 166). Auch erklärte die histologisch nachweisbare Lymphozytenverarmung peripherer lymphatischer Gewebe (93, 119, 123, 124, 154) eine zytotoxische Reaktion. Diese Hypothese wird des weiteren durch die Beobachtung des Anstiegs der Serumharnstoffwerte in unter ALG-Immunsuppression stehenden Autotransplantaten gestützt. Die periphere Leukopenie, von der jede Zellart betroffen ist, wird durch Zytolyse verursacht. Während dieser zytotoxischen Reaktionen kommt es infolge der Erhöhung des Proteinabbaus zu einer Anhäufung des Endprodukts des Eiweißstoffwechsels.

Im Rahmen der Leukopenie setzt unmittelbar in den ersten Minuten nach Serumapplikation eine direkte, signifikante Lymphozytenreduktion ein, die ausgeprägt 6 Stunden anhält. Trotz des festzustellenden geringen Anstiegs in der Folgezeit werden präapplikative Werte schließlich nicht angeglichen (123).

Periphere Monozyten hingegen nehmen ab dem 3. p. op. Tag unter dem Einfluß des ALG leicht zu (128), obwohl auch sie unmittelbar nach Injektion vermindert

werden. Diese Abnahme ist aber zum einen schwächer als die der Lymphozyten, zum anderen übersteigen diese Zellen nach schneller Regeneration bereits nach 9 Stunden ihre Ausgangswerte. Weder renale Autotransplantate allein noch in Kombination mit einer ALG-Behandlung lassen eine solche Monozytenerhöhung feststellen. Die unter der Wirkung antilymphozytärer Antikörper festzustellende periphere Monozytose wird demgemäß spezifisch durch Alloantigene verursacht.

Auch segmentkernige und eosinophile Granulozyten sind unmittelbar nach ALG-Applikation vermindert. Nach kontinuierlicher Regeneration gleichen sie ihre Ausgangshöhen wieder an.

ALG führt also im Blut zu einer zytotoxisch bedingten, allgemeinen Leukopenie. Bei Wirkungsreduktion des Antiserums zeigt sich in Allotransplantaten anschließend eine selektive Inhibition der Erholung der Lymphozyten bei gleichzeitiger, schneller Bereitstellung von Monozyten und stabkernigen Granulozyten. Es ist denkbar, daß sehr niedrige ALG-Serumspiegel zwar immer noch ausreichen, Lymphozyten signifikant zu reduzieren, aber bei abnehmender Wirkung nicht mehr in der Lage sind, die anderen Leukozytenpopulationen entsprechend mit zu vermindern.

(c) ALG-Wirkungen im Transplantat:

Die Höhe des Lymphozytotoxizitätstiters (86, 123) sowie hohe Serumspiegel (75, 89) bestimmen die Intensität der immunsuppressiven Wirkung des Antiserums. Die Einflüsse antilymphozytärer Antikörper direkt im Transplantat wurden jedoch mit einem weniger suppressiv wirkenden ALG analysiert. Dies

deshalb, weil unter massiver Immunsuppression kleinste Veränderungen der in-situ-Zellverteilungen nicht eindeutig bestimmt werden können.

Das Ergebnis der fehlenden zellulären Infiltration renaler Autotransplantate (58) bei Anwendung der FNAB konnte bestätigt werden. Dies rechtfertigt den Einsatz der FNAB und TAC zur Analyse der ALG-Wirkung auf einzelne Zellspezifitäten in Allotransplantaten.

Nicht immunsupprimierte Tiere zeigen während desselben Zeitraumes wie unbehandelte Nieren- (8) und Herz- (144, 149, 151) Ratten-Allotransplantate eine starke Zunahme der in-situ-Infiltration. Am Inflammationshöhepunkt invadieren insbesondere Lymphozyten, Monozyten, Lymphoblasten und Makrophagen das Transplantat, weniger beteiligt sind Plasmablasten, Plasmazellen. Diese zelluläre in-situ-Verteilung stimmt mit den durch verschiedene immunologischen Nachweismethoden bestimmten zellulären Inflammationen abgestoßener Herztransplantate (144, 149, 150), Nierentransplantate (60, 102, 114, 148, 160) und "Schwammimplantate" (2, 59, 131) überein. Nach starker Zunahme nehmen Lymphozyten und Monozyten in unbehandelten Transplantaten schließlich wieder ab (151). Der nach dem Inflammationshöhepunkt anhaltende Lymphoblasteninflux konnte mit der Immunfluoreszenztechnik nicht bestätigt werden (8).

Die während Abstoßungsreaktionen in nicht immunsupprimierten Hundenieren-Allotransplantaten feinnadelbioptisch bestimmte Beteiligung der Lymphozyten und Monozyten ist zahlenmäßig gegenüber menschlichen renalen Abstoßungen erhöht, die der Makrophagen, Lymphoblasten, Plasmablasten und Plasmazellen gleich

(62, 159).

Die TAC-Ergebnisse lassen also erkennen, daß an der Abstoßungsreaktion nicht immunsuppressiv behandelter Hundenieren-Allotransplantate nach schneller in-situ-Infiltration insbesondere Lymphozyten, Lymphoblasten und Makrophagen beteiligt sind.

Unter niedrig dosierter ALG-Behandlung hingegen zeigen die relativen und absoluten Incremente einzelner Leukozytenpopulationen, aber auch beonders das absolute Leukozytenincrement und der Inflammationsfaktor am 7. p. op. Tag eine ausgeprägte zelluläre in-situ-Infiltration.

Maßgeblich beteiligt an dieser Inflammation sind Plasmablasten, Plasmazellen, Monozyten und Makrophagen. Nicht oder zumindest nur gering wirken an dieser Transplantatreaktion Lymphozyten und Lymphoblasten mit. Auch in den mit ALG behandelten Autotransplantaten findet man eine ausgeprägte in-situ-Lymphopenie. Die direkte Wirkung antilymphozytärer Antikörper besteht also in einer langanhaltenden signifikanten Lymphozytenreduktion, die in Allotransplantaten zwischen dem 2. und 3. p. op. Tag einsetzt. Gleichzeitig ist auch die Zahl der Lymphoblasten stark vermindert.

Plasmablasten und Plasmazellen sind hingegen im Vergleich zu den Kontrolltieren am Inflammationshöhepunkt vermehrt nachweisbar.

Auch in menschlichen allogenen Nierentransplantaten konnten unter ALG-Immunsuppression entsprechende Verminderungen der Lymphozyten und Lymphoblasten, aber auch der Monozyten, beobachtet werden (67). In mit ALG behandelten Hundennieren-Allotransplantaten hingegen zeigt sich eine verstärkte Monozyteninflammation. Eine solche Monozytenerhöhung wird häufiger

unter ALG-Therapie (122) beobachtet und führte sogar zu der Idee, ein Anti-Makrophagen-Serum zu entwickeln (28).

Nach anti-idiotypischer Immunisierung (16) eines Empfängertieres mit gereinigten Lymphoblasten des zukünftigen Spendertieres verlängerte sich im Hundemodell die Transplantatfunktionszeit gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe auf 10,0 ± 4,5 Tage (14). Auch bei dieser Versuchsanordnung zeigte die TAC eine in-situ-Monozytose bei gleichzeitiger Minderung der lymphozytären Transplantatinflammation (14).

Die immunsuppressive Behandlung von 10 allogenen Hunde-Nierentransplantaten mit Cyclosporin A während der ersten 14 p. op. Tage läßt in der TAC eine Reduktion der Lymphozyten- und Monozyteninflammation erkennen (82). Nach Absetzen der Immunsuppression wurde bei feinnadelbioptisch nachgewiesener Abstoßungsreaktion die immunsuppressive Therapie bei 5 Tieren mit Cyclosporin A und bei 5 Tieren mit ALG wieder begonnen. Die Cyclosporin A-Therapie führte erneut zu einer Abnahme des Monozyten- und Lymphozytenincrements (82). Nach Umsetzen der immunsuppressiven Behandlung auf ALG fand man zwar auch eine Abnahme der in-situ-Lymphozyten (82), die Monozyteninfiltration nahm jedoch in demselben Zeitraum stark zu (82).

ALG behandelte Autotransplantate lassen keine in-situ-Monozytose erkennen. Die in Allotransplantaten zu beobachtende verstärkte Monozyteninfiltration wird also nicht durch antilymphozytäre Antikörper, sondern durch Alloantigene hervorgerufen.

Es ist denkbar, daß ALG in die Kooperation zwischen Monozyten und Lymphozyten eingreift: Monozyten beein-

flussen nämlich den afferenten und efferenten Schenkel der Immunreaktion (Abb. 20). Da die Präsentation des Antigens durch Monozyten T-Lymphozyten abhängig ist (11, 12, 13, 24, 31, 42, 58, 73, 85, 96) infiltrieren infolge des durch ALG induzierten in-situ-Lymphozytendefizits die weniger ALG sensitiven Monozyten das Transplantat, um die antigene Fokussierung fortzusetzen. Dies bedeutet zwar nicht das Aussetzen des immunologischen Reaktionsbeginns, aber doch eine Verzögerung der antigenen Erkennung. Gestützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, daß die Intensität immunologischer Abwehrvorgänge bei erhöhten Monozytenkonzentrationen sich zunächst abgeschwächt darstellt (13, 90).

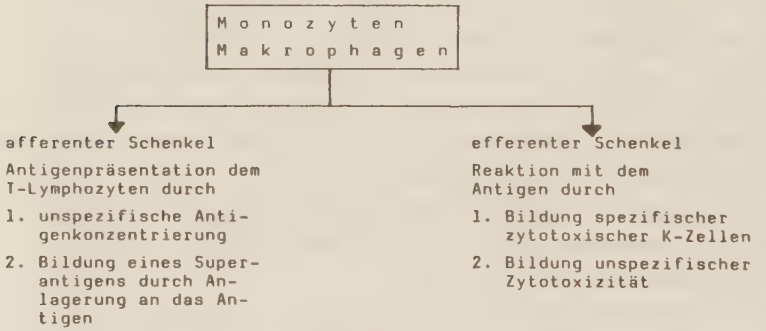


Abb. 20: Monozyten/Makrophagen beeinflussen den afferenten und efferenten Schenkel der Immunreaktion.

Dem schließlich doch einsetzenden Abstoßungsreaktionsbeginn könnten drei mögliche Ursachen zugrundeliegen:

1. Trotz der Wirkung antilymphozytärer Antikörper wird endlich doch ein für die Antigenerkennung ausreichendes T-Lymphozytenniveau erreicht; in den dargestellten Versuchen fände dies etwa am 7. Tag statt;
2. mit dem Erreichen einer bestimmten Monozytenkonzentration im Sinne eines Schwellenwerteffekts wird das Antigen schließlich doch so stark fokussiert, daß seine immunologische Erkennung erfolgen kann;
3. möglich ist aber auch, daß eine hohe Monozytenkonzentration ausgeprägte, unspezifische zytotoxische Reaktionen induziert (41), die dann zur Transplantatdestruktion führen.

Bemerkenswert ist, daß nach dem Erreichen einer maximalen Monozyteninflammation die renalen Retentionsparameter ansteigen und die Makrophagen - bei begleitender Abnahme der in-situ-Monozyten - verstärkt das Transplantat infiltrieren.

Bis zum 5. p. op. Tag bewirken antilymphozytäre Antikörper eine signifikante in-situ-Reduktion der Lymphoblasten. Der bereits beschriebene periphere Einfluß auf T-Lymphozyten (72, 84, 130) zeigt sich somit auch im Transplantat. Die jedoch nur limitierte Wirkung auf in-situ-Lymphoblasten resultiert aus der Verwendung eines weniger wirksamen Antiserums: Bei Rattenhaut-Allotransplantaten konnte man nachweisen, daß höhere Dosen antilymphozytärer Antikörper nicht nur die Transplantatüberlebenszeit erhöhen, sondern zudem in vitro auch die Reaktionsantwort der Lymphoblasten auf T-Zell-Mitogenstimulatoren vermindern (171).

Nach dem Erreichen der maximalen Lymphoblasteninflammation nehmen die mononukleären Zellen im Transplantat ab (102). Gleichzeitig verschlechtern sich die renalen Serum-Retentionsparameter. Dies zeigt, daß T-Lymphozyten von wesentlicher Bedeutung für die Transplantatabstoßung sind. Sie wirken wahrscheinlich gegen das Membranantigen direkt im Transplantat zytotoxisch (64, 150) und zerstören es schließlich.

Plasmablasten und Plasmazellen werden hingegen vom ALG geringer beeinflußt. Es findet sich zwar unter der Wirkung antilymphozytärer Antikörper in den ersten 4 p. op. Tagen eine in-situ-Reduktion, jedoch erscheinen am Inflammationsmaximum mehr B-Lymphozyten im Transplantat als in dem unbehandelter Tiere. Dieser feinnadelbioptisch sich ergebende Befund korreliert mit den histologischen Ergebnissen einer unter ALG Applikation verstärkten humoralen Immunreaktion.

Diese Untersuchungen zeigen, daß antilymphozytäre Antikörper - sogar in geringer Dosierung - auf die zellvermittelte (95), und nicht auf die humorale (163) Immunreaktion wirken. Diese Reaktion zeigt sich nicht nur im Blut, sondern auch im Transplantat.

Die Präsenz der Makrophagen wird - wie therapierte bzw. nicht behandelte Autotransplantate zeigen - durch Alloantigene induziert. Antilymphozytäre Antikörper wirken aber nicht auf diese Zellpopulation. Unmittelbar nach der verstärkten monozytären Inflammation infiltrieren sie sowohl behandelte als auch nicht immunsupprimierte Nieren-Allotransplantate (62, 64).

Die einzelnen Granulozytenpopulationen lassen keine spezifische in-situ-ALG-Wirkung erkennen: Stabkernige und eosinophile Granulozyten sind unter ALG-Therapie nicht im Transplantat, sondern nur in der Peripherie - sowohl nach Allo- als auch nach Autotransplanta-

tionen - leicht erhöht. Die Alterationen des Verlaufs segmentkerniger Granulozyten sind auf die Technik der prozentualen Leukozytendifferenzierung zurückzuführen. Ihre Abfälle und Minima sind von den Anstiegen und Maxima immunkompetenter Zellen begleitet.

Die Ergebnisse der in kurzen Intervallen ausgeführten Biopsien der Versuchsgruppe 3 detaillieren noch die Analyse der in-situ-Wirkung antilymphozytärer Antikörper: Der Inflammationsfaktor und das absolute Leukozytenincrement lassen auch im Transplantat eine allgemeine Leukopenie nach Serumapplikation erkennen. Diese Reduktion setzt im Transplantat jedoch zeitlich später und geringer ausgepägt als in der Peripherie ein. Bezogen auf die Zellzahlausgangswerte haben in-situ-Lymphoblasten (43%), in-situ-Lymphozyten (60%) und in-situ-Monozyten (68%) erst nach 3 Stunden Minima erreicht. Segmentkernige Granulozyten sind nach 30 Minuten nur unwesentlich in-situ (88% der Ausgangshöhe) vermindert und wandern bis zur 3. Stunde verstärkt in das Transplantat ein. Stabkernige Granulozyten hingegen sind reaktiv, insbesondere während der 1. Stunde post injectionem, im Transplantat vermehrt anzutreffen.

Plasmablasten, Plasmazellen und Makrophagen sind durch ALG nur sehr schwach beeinflußt.

Die einzelnen Zellpopulationen zeigen auch im Transplantat unterschiedliche Regenerationsgeschwindigkeiten. Während der Anteil der Lymphozyten und Lymphoblasten signifikant vermindert bleibt, also ihre Ausgangshöhen nicht wieder angleichen, wandern Monozyten schneller in das Transplantat ein und überschreiten auch früher als in der Peripherie präapplikative Werte. Während der Zellerholung infiltrieren diese Zellen also unmittelbar nach peripherer Bereitstellung das Transplantat.

Die in der ersten Stunde auftretende Zunahme der Lymphozytenincrementwerte mit anschließendem, verzögertem Abfall beweist die primäre Wirkung antilymphozytärer Antikörper auf zirkulierende Lymphozyten (18, 19, 37, 39, 69, 93, 116). Dies deshalb, weil diese Werte durch den schneller erfolgenden intravasalen Abfall beeinflußt werden. Sowohl die absoluten als auch die relativen Incremente stützen die Theorie, daß im Rahmen einer allgemeinen Leukopenie ALG anhaltend signifikante in-situ-Reduktionen der Lymphozyten und Lymphoblasten mit nachfolgender Regenerationshemmung bewirkt. Plasmablasten und Plasmazellen sind auch bei Betrachtung absoluter Incrementverläufe kaum beeinflußt. Monozyten überschreiten nach schneller Zellerholung präapplikative Werte.

Die später und schwächer ausgeprägte in-situ-Leukopenie erklärt sich aus der Tatsache, daß antilymphozytäre Antikörper zunächst über die Blutzirkulation das Transplantat erreichen müssen. Während dieses intravasalen Transports wird die Wirkeffizienz des Antiserums der kurzen Halbwertzeit (5, 92) wegen gemindert. Die sich schließlich einstellenden signifikanten Reduktionen der Lymphozyten und Lymphoblasten beruhen auf der kontinuierlichen Hemmung der Regeneration dieser Zellen bei wiederholten Serumapplikationen.

Die immunsuppressive Wirkung des ALG kann demgemäß durch kürzere Dosisintervalle (10, 123, 153), höhere Zytotoxizitätstiter (86, 123) und damit höheren Serum-Wirkkonzentrationen (75, 89) verstärkt werden.

In diesem Zusammenhang ist es aber von essentieller Bedeutung, eine frühestmögliche Applikation antilymphozytärer Antikörper schon im Beginn von Abstoßungsreaktionen zu gewährleisten. Während der Transplantatabstoßung werden nämlich renale Segment- und Interlobulararterien verschlossen sowie Rindengefäße rarefiziert (103). Diese intrarenalen vaskulären Veränderungen

mindern den Blutdurchfluß (88, 103) mit der Folge, daß der zirkulationsabhängige Transport des ALG (93) zum einen stark eingeschränkt wird und zum anderen infolge der gestörten Mikrozirkulation weniger intrarenale Inflammationsherde erreicht werden.

Daraus leitet sich ab, daß nur die schnelle und sichere Diagnostik von Abstoßungsreaktionen frühestmögliche ALG-Applikationen gewährleistet. Die praktische Durchführung dieser Folgerung erscheint durch die FNAB und TAC sowie auch entsprechende Coulter Counter Bestimmungen möglich. Da jedoch periphere Veränderungen die Incrementwerte beeinflussen, sollten alle Parameter der Diagnostik (relative und absolute Zellverteilungen der Gesamtleukozyten und einzelner Leukozytenspezifitäten sowohl im Blut als auch im Transplantat, das relative und absolute Increment sowie auch der sich ergebende Inflammationsfaktor) zunächst selektiv betrachtet werden. Die zunächst gesonderte Beurteilung und anschließende Gesamtbewertung der einzelnen Parameter führt dann zu einer zuverlässigen Diagnose des immununologischen Zustands eines Transplantats mit entsprechenden Behandlungsvorschlägen und Therapiekontrollen.

Man kann also feststellen, daß antilymphozytäre Antikörper eine hoch suppressive Wirkung auch im Transplantat entfalten. Diese Wirkung besteht in einer allgemeinen in-situ-Leukopenie mit signifikanter, selektiver Reduktion und Inhibition der für immunologische Transplantat-Abstoßungsreaktionen wichtigen Mediatoren der zellulären Immunreaktion, nämlich Lymphozyten und Lymphoblasten (3, 49, 58, 96, 111). Das humorale Immunsystem (95), Monozyten und Makrophagen werden nicht beeinflußt.

6.4 Histologie:

Auch im histologischen Präparat waren die zellulären Reaktionen unter ALG-Therapie weit geringer ausgeprägt als in unbehandelten Transplantaten. Dagegen zeigte sich unter der immunsuppressiven Therapie eine stärkere Beteiligung des humoralen Immunsystems. Diese histologischen Ergebnisse bestätigen also die feinnadelbioptisch-zytologischen Befunde.

Eine ausgepägte zelluläre Beteiligung war hingegen bei unbehandelten Transplantaten festzustellen. Diese Erscheinung unterstreicht die Bedeutung des zellulären Immunsystems bei der Transplantatabstoßung und verdeutlicht ferner, daß es möglich ist, die zelluläre Abstoßungsreaktion durch ALG zu verzögern bzw. zu unterdrücken.

Spezifisch durch antilymphozytäre Antikörper induzierte Transplantatschäden konnten histologisch nicht beobachtet werden. Es zeigte sich weder in behandelten Allo- noch Autotransplantaten eine durch im Antiserum enthaltene Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran ausgelöste Masugi-Glomerulonephritis (123, 152, 173) noch eine Serum-Glomerulonephritis, die nach Entwicklung einer Immunreaktion auf heterologes Protein zu Deposition von Antigen-/Antikörperkomplexen in der Niere führt (152).

7. ZUSAMMENFASSUNG:

1. Die vorliegenden Untersuchungen zielten auf:

   (a) Die Bestimmung der ALG-Wirkungen im Blut und im Transplantat nach allogenen und autologen Hunde-Nierentransplantationen im Vergleich zu nicht immunsupprimierten Tieren,

   (b) die Überprüfung der Zuverlässigkeit der FNAB;

   (c) die Erfassung möglicher Nebenwirkungen der FNAB;

   (d) die Erarbeitung einer methodischen Modifikation der TAC zur Erleichterung der Diagnostik der immunologischen Reaktion eines Transplantats.

2. Die Ergebnisse der Analyse der immunsuppressiven Wirkungen des ALG waren:

   (a) Im Blut zeigte sich sowohl nach Auto- als auch nach Allotransplantationen eine signifikante Reduktion der Lymphozyten ($p < 0{,}001$). Eine gleich-

zeitig festzustellende, leichte Erhöhung der Monozyten wurde nicht spezifisch durch ALG, sondern durch Alloantigene hervorgerufen.

Unmittelbar nach Applikation bewirkte ALG eine allgemeine Leukopenie, die jede Zellspezifität betraf. Die Regeneration einzelner Leukozytenpopulationen erfolgte unterschiedlich schnell: Die stärkste Hemmung der Regeneration war bei den Lymphozyten nachzuweisen. Monozyten glichen schnell präapplikative Werte an und überschritten sie. Die reaktive Erhöhung stabkerniger Granulozyten läßt eine zytotoxische Reaktion möglich erscheinen. Sie schließt eine "Verschiebungsleukopenie" im Sinne einer Veränderung des Verhältnisses zirkulierender zu rezirkulierenden Leukozyten als möglichen Wirkungsmechanismus aus.

(b) Im Transplantat waren Lymphozyten sowohl nach Auto- als auch nach Allotransplantationen signifikant vermindert ($p < 0{,}001$). Im allogenen System zeigte sich zudem eine signifikante Lymphoblastenreduktion ($p < 0{,}05$). Die Lymphozytenreduktion war von einer verstärkten Monozyteninfiltration im Transplantat begleitet. Es zeigte sich eine verzögerte Erkennung der Alloantigene.

Unmittelbar nach Applikation des ALG stellte sich eine im Vergleich zur Peripherie spätere und geringere in-situ-Leukopenie ein. Dies wohl deshalb, weil das ALG zunächst über den Blutweg das Transplantat erreichen mußte. Bis auf die stabkernigen Granulozyten, die sofort reaktiv das Transplantat infiltrierten, wurden alle anderen Zellspezifitäten in unterschiedlichem Ausmaß zytotoxisch beeinflußt. Ohne Angleichung ihrer Ausgangswerte waren Lymphozyten und Lymphoblasten langanhaltend und signifikant reduziert. Monozyten regenerierten in-situ schneller als peripher und überschritten anschließend präapplikative Werte.

Das humorale Immunsystem und Makrophagen zeigten nur eine schwache bzw. keine Beeinflussung.

(c) Sowohl feinnadelbioptisch-zytologisch als auch histologisch war unter ALG-Therapie eine Inhibition der Transplantatabstoßung durch Hemmung des zellulären Immunsystems festzustellen.

3. Die TAC stellt im Tierexperiment eine zuverlässige Methode zum Nachweis von Abstoßungsreaktionen dar. Die TAC zeigte weder bei immunsupprimierten noch bei unbehandelten Autotransplantaten Abstoßungsreaktionen an.

4. Bei technisch einwandfreier Ausführung der FNAB konnten keine Nebenwirkungen der Feinnadelpunktionen nachgewiesen werden.

5. Die methodische Modifikation der Incrementberechnung führt zu:

(a) einer genaueren Berechnung des Increments und damit exakteren Bestimmung der Transplantatinflammation;

(b) einer besseren Erkennung insbesondere von Übergangsstadien einzelner Episoden von Abstoßungsreaktionen,

(c) einer Erhöhung der Zuverlässigkeit und Erleichterung der Diagnostik des immunologischen Zustandes eines Transplantats infolge der Anwendung und Beurteilung mehrerer, teils neuer, diagnostischer Kriterien.

6. Auch im Transplantat stellt ALG ein hochwirksames Immunsuppressivum dar.

Die TAC und die modifizierte Incrementberechnung könnten in Zukunft zur Überwachung einer individuellen immunsuppressiven Therapie sowie zuverlässigen Therapiekontrolle in der Klinik beitragen.

8. LITERATURNACHWEIS:

(1) ABAZA, H. M.; NOLAN, B.; WATT, J. G.; WOODRUFF, M. F. A.:

Effect of antilymphocytic serum on the survival of renal homotransplants in dogs.
Transplantation 4, 618, 1966

(2) ASCHER, N. L.; FERGUSON, R. M.; HOFFMAN, R.; SIMMONS, R. L.:

Partial characterization of cytotoxic cells infiltrating sponge matrix allografts.
Transplantation 27, 254, 1979

(3) BACH, F. H.; GOSE, J. E.:

Cellular basis of allograft rejection.
Transplant. Proc. 13, 1063, 1981

(4) BACH, J. F.:

Les sérum antilymphocytes.
Rev. Eur. Etud. Clin. Biol. 15, 258, 1970

(5) BACH, J. F.:

Immunosuppression by chemical agents.
Transplant. Proc. 3, 27, 1971

(6) BACH, J. F.:

Immunosuppression in organ transplantation: Past, present and future.
Transplant. Proc. 12, 588, 1980

(7) BACH, J. F.; GIGLI, J.; DARDENNE, M.; DORMONT, J.:

Mechanism of complement action in rosette inhibition and lymphocytotoxicity of antilymphocyte serum.
Immunology 22, 625, 1972

(8) BALCH, C. M.; WILSON, C. B.; LEE, S.; FELDMAN, J. D.:

Thymus dependent lymphocytes in tissue sections of rejectin rat renal allografts.
J. exp. Med. 138, 1584, 1973

(9) BALNER, H.:

Choice of animal species for modern transplantation research.
Transplant Proc. 6, 19, 1974

(10) BERENBAUM, M. C.; BRENT, L.; KILSHAW, P. J.:

The therapeutic significance of the dose response curve for antilymphocytic serum.
Transplantation 12, 18, 1971

(11) BERGHOLTZ, B. O.; THORSBY, E.:

Macrophage-dependent response of immune human T-lymphocytes to PPD in vitro.
Scand. J. Immunol. 6, 779, 1977

(12) BERGHOLTZ, B. O.; THORSBY, E.:

HLA-D restriction of the macrophage dependent response of immune human T-lymhocytes to PPD in vitro: Inhibition by anti-HLA-DR antisera.
Scand. J. Immunol. 8, 63, 1978

(13) BERGHOLTZ, B. O.; THORSBY, E.:

Macrophage/T-lymphocyte interaction in the immune response to PPD in humans.
Scand. J. Immunol. 9, 511, 1979

(14) BERNHEIM, C.:

Inauguraldissertation, 1984

(15) BESREDKA, A.:

La leukotoxine et son action sur le systeme leukocytaire.
Ann. Inst. Pasteur 14, 390, 1900

(16) BINZ, H.; WIGZELL, H.:

Induction of specific transplantation tolerance in adult animals
Transplant. Proc. 11, 914, 1979

(17) BIRTCH, A. G.; CARPENTER, C. B.; TILNEY, N. L.; HAMPERS, C. L.; HAGER, F. B.; LEVINE, L.; WILSON, R. E.; MURRAY, J. E.:

Controlled clinical trial of antilymphocyte globulin in human renal allografts.
Transplant. Proc. 3, 762, 1971

(18) BISHOP, G.; COSIMI, A. B.; VOYNOW, N. K.; WHELCHEL, J. D.; WORTIS, H. H.:

Effect of immunsuppressive therapy for renal allografts on the number of circulating sheep red blood cell rosetting cells.
Transplantation 20, 123, 1975

(19) BRENDEL, W.:

The clinical use of ALG.
Transplant. Proc. 3, 280, 1971

(20) BRENT, L.; COURTENAY, T.; GOWLAND, G.:

Immunological reactivity of lymphoid cells after treatment with anti-lymphocytic serum.
Nature (Lond.) 215, 1461, 1967

(21) BROCHIER, J.; REVILLARD, J. P.:

In vitro stimulation or inhibition of lymphocyte activation by antilymphocyte serum.
Transplant. Proc. 3, 788, 1971

(22) BRUNNER, K. T.; MAUEL, J.; CERRROTINI, J. C.:

Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.
Immunology 14, 181, 1968

(23) BUNN, H. F.:

Disorders of the hematopoetic system.
In: Thorn, G. W.; Adams, R. G.; Braunwald, E.; Isselbacher, K. J.; Petersdorf, R. G.:
Harrison's principles of internal medicine, Vol. 2, 8^{th} ed., S. 1648
Mc Graw-Hill Book Company, N. Y., 1977

(24) BURGER, R.; FORD,D.; VETTO, R. M; HAMBLIN, A.; GOLDSTEIN, A.; HUBBARD, M.; DUMONDE, D. C.:

Endothelial cell presentation of antigen to human T-cells.
H. Immunol. 3, 209, 1981

(25) CALNE, R. Y.:

Renal transplantation.
Williams & Wilkins, Baltimore, 1963

(26) CASTRO, L. A.; HAMMER, C.; LAND, W.; HILLEBRAND, G.; GURLAND, H. J.:

Clinicopathologic evaluation of fine-needle biopsy in kidney transplant.
Transplant. Proc. 14, 196, 1982

(27) CHATTERJEE, S. N.; GERSHWIN, M. E.; ECKLES, D.:

Characterization and alterations of lymphocyte subpopulation in renal allograft recipients.
Transplantat. Proc. 11, 374, 1979

(28) CHAUSSY, C.; HAMMER, C.; PONGRATZ, H.; SCHEEL v., J.; PFEIFER, K. J.; LAND, W.; SOLLINGER, H. W.; PIELSTICKER, R.; BRENDEL, W.:

Prolongation of graft survival in rats and dogs by a specific antimacrophage serum (AMS).
Transplant. Proc. 7, 779, 1975

(29) CHEW, W. B.; LAWRENCE, J. S.:

Antilymphocyte serum.
J. Immunol. 33, 217, 1937

(30) CHRISTIAN, H. A.; LEEN, J. F.:

Some further observations on leukocytoxins.
Boston Med. Surg. J. 152, 397, 1905

(31) CLINE, M. J.; SWEET, V. C.:

The interaction of human monocytes and lymphocytes.
J. exp. Med. 128, 1309, 1968

(32) COLLSTE, L. G.; GROTH, C. G.; KASHIWAGI, N.; SCHANTZ, B.:

The influence of route of ALG administration on canine renal allograft survival.
Transplantation 12, 91, 1971

(33) DANDAVINO, R.; BARCELO, R.; BEAUDRY, C.; CARDINAL, J.; CARRIERE, S.: FRIBORG, J.; HOUD, M.; QUIMET, D.; BASTIEN, E.; GERARD, R.; LAPLANTE, L.:

Cadaver kidney transplantation: A retrospective comparision of two immunosuppressive regimens.
Transplant. Proc. 14, 635, 1982

(34) DAVIS, R. C.; GLASGOW, A. H.; WILLIAMS, L. F. jr.; NABSETH, D. C.; ORLSSON, C. A.; SCHMITT, G. W.; IDELSON, B. A.; COOPERBAND, S. R.; HARRINGTON, J. T.; MANNICK, J. A.:

Trial of rabbit antihuman ALG in cadaver kidney transplantation.
Transplant. Proc. 3, 766, 1971

(35) DEMPSTER, W. J.:

Kidney homotransplantation.
Brit. J. Surg. 40, 447, 1953

(36) DENMAN, A. M.:

Anti-lymphocytic antibodies and autoimmune disease.
Clin. Exp. Immunol. 5, 217, 1969

(37) DENMAN, A. M.; DENMAN, E. J.; HOLBOROW, E. J.:

Immunosuppressive effects of lymphoid cell proliferation in mice receiving antilymphocyte globulin.
Nature (Lond.) 217, 177, 1968

(38) DENMAN, A. M.; FRENKEL, E. P.:

Mode of action of anti-lymphocytic globulin: I. The distribution of rabbit anti-lymphocyte globulin injected into rats and mice.
Immunology 14, 107, 1968

(39) DENMAN, A. M.; FRENKEL, E. P.:

Mode of action of anti-lymphocytic globulin: II. Changes in the lymphoid cell populations in rats treated with anti-lymphocyte globulin. Immunology 14, 115, 1968

(40) DEODHAR, S. D.; KONOMI, K.; NAKAMOTO, S.; KURUVILA, K. C.:

Clinical experience with antilymphocyte globulin (ALG) in renal transplantation. Transplant. Proc. 3, 758, 1971

(41) DIMITRU, A.; DY, M.; CAMBARRIERE, M.; MELLOR, J.; HAMBURGER, J.:

Macrophage cytotoxicity induced by allografts. Transplant. Proc. 7 (Suppl. 1), 255, 1975

(42) DY, M.; DEBRAY-SACHS, M.; DESCAMPS, B.:

Role of macrophages in allograft rejection. Transplant. Proc. 1, 811, 1979

(43) EVANS, D. M.; FABRE, J. W.; MILLARD, P. R.; MORRIS, P. J.:

Effect of splenectomy alone and in combination with antilymphocyte serum on renal allograft rejection in the rat. Transplantation 27, 389, 1979

(44) FLEXNER, S.:

The pathology of lymphotoxic and myelotoxic intoxication. Univ. Penn. Med. Bull. 15, 287, 1902

(45) FLOERSHEIM, G. L.:

Pharmacologic immunosuppressive agents.
Transplant. Proc. 12, 315, 1980

(46) FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.:

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2. Auflage, S. 497
Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich, 1977

(47) FRANK, J. N.; Mc DONALD, D.F.:

Urology.
in: Schwartz, J. S.: Principles of Surgery, 3th ed., S. 1701
Mc Graw-Hill Book Company, N. Y., 1979

(48) GELSTHORPE, K.; DOUGHTY, R. W.:

The role of human complement in the lymphocytotoxicity test.
Transplantation 15, 347, 1973

(49) GOWANS, J. L.:

Cellular mediators of allograft immunity.
Transplant. Proc. 9, 685, 1977

(50) GRABAR, P.:

Some critical remarks and suggestions about antilymphocyte serum.
Transplant. Proc. 4, 407, 1972

(51) GROTH, C. G.:

The value of ALG and ATG in clinical renal transplantation - recent european experience. Transplant. Proc. 13, 460, 1981

(52) GUTTMAN, R. D.; CARPENTER, C. B.; LINDQUIST, R. R.; MERRILL, J. P.:

Renal transplantation in the inbred rat. III. A study of heterologous antithymocyte serum. J. exp. Med. 126, 1099, 1967

(53) GUTTMAN, R. D.; CARPENTER, C. B.; LINDQUIST, R. R.; MERRILL, J. P.:

An immunosuppressive site of action of heterologous antilymphocytic serum.
Lancet 1, 248, 1967

(54) GUTTMAN, R. D.; CARPENTER, C. B.; LINDQUIST, R. R.; MERRILL, J. P.:

Treatment with heterologous antithymocyte antisera: Nephritis associated with modification of renal allograft rejection and the immune status of the host to the foreign antigen.
Transplantation 5, 1115, 1967

(55) GUTTMAN, R. D.; LINDQUIST, R. R.; OCKER, S. A.; MERRILL, J. P.:

Mechanisms of long-term survival of renal allografts after treatment with antilymphocyte antibody.
Transplant. Proc. 1, 463, 1969

(56) HALASZ, N. A.; ORLOFF, M. J.; HIROSE, F.:
Increased survival of renal homografts in dogs after injection of graft donor blood.
Transplantation 2, 453, 1964

(57) HALLORAN, P. F.; LIEN, J.; APRILE, M.; WHITE, N.:
Preliminary results of a randomized comparison of cyclosporine and minnesota antilymphoblast globulin.
Transplant. Proc. 14, 627, 1982

(58) HÄYRY, P.:
Immunobiology of transplant rejection.
Ann. Clin. Res. 13, 172, 1981

(59) HÄYRY, P.; ROBERTS, P. J.:
Allograft-infiltrating killer cells.
Transplant. Proc. 9, 691, 1977

(60) HÄYRY, P.; SOOTS, A.; WILLEBRAND v., E; WIKTOROWICZ, K.:
Composition, subclass distribution, and preliminary analysis of the functions of host inflammatory cells infiltrating renal allografts during rejection.
Transplant. Proc. 11, 785, 1979

(61) HÄYRY, P.; WILLEBRAND v., E:
Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts.
Ann. Clin. Res. 13, 288, 1981

(62) HÄYRY, P.; WILLEBRAND v., E:

Monitoring of human renal allograft rejection with fine-needle aspiration cytology.
Scand. J. Immunol. 13, 87, 1981

(63) HÄYRY, P.; WILLEBRAND v., E:

Cytologic evaluation of in situ inflammatory response of rejection in human renal transplantation.
Transplant. Proc. 13, 81, 1981

(64) HÄYRY, P.; WILLEBRAND v., E; SOOTS, A.:

In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection: III. Kinetics of the inflammatory response and generation of donor-directed killer cells.
Scand. J. Immunol. 10, 95, 1979

(65) HAMMER, C.; HÄYRY, P.; WILLEBRAND v., E.; et al.:

International workshop of FNAB in Munich.
August 1982

(66) HAMMER, C.; KREBS, G.; CHAUSSY, C.; PFEIFER, K.; SCHMIDT, K.; LAND, W.; BRENDEL, W.:

Mitigation of hyperacute rejection by antilymphocyte globulin (ALG).
Transplant. Proc. 1, 31, 1979

(67) HAMMER, C.; LAND, W.; HILLEBRAND, G.; RÖSSLER, E.:

Fine needle biopsy and aspiration cytology as control for renal rejection episodes.
Surg. Forum 4, 17, 1982

(68) HARDY, M. A.; QUINT, J.; STATE, D.:

Effect of antilymphocyte serum and other immunosuppressive agents on canine jejunal allografts.
Ann. Surg. 171, 51, 1970

(69) HARRIS, N. S.; MERINO, G. E.; NAJARIAN, J. S.:

Mode of action of antilymphocyte sera (ALS).
Transplant. Proc. 3, 797, 1971

(70) HECKNER, F.:

Praktikum der mikroskopischen Hämatologie, 5. Auflage.
Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 1981

(71) HEYWORTH, M. F.:

Effects of antilymphocytic globulin in human subjects.
Immunology 43, 793, 1981

(72) HEYWORTH, M. F.:

Clinical experience with antilymphocyte serum.
Immunol. Rev. 65, 79, 1982

(73) HIRSCHBERG, H.; HIRSCHBERG, T.; JAFFE, E.; THORSBY, E.:

Antigen-presenting properties of human vascular endothelial cells: Inhibition by Anti-HLA-DR antisera.
Scand. J. Immunol. 14, 545, 1981

(74) HOITSMA, A. J.; REEKERS, P.; KREEFTENBERG, J. G.; LIER, v. H. J. J.; CAPEL, P. J. A.; KOENE, R. A. P.:

Treatment of acute rejection of cadaveric renal allografts with rabbit antithymocyte globulin.
Transplantation 33, 12, 1982

(75) HOWARD, R. J.; CONDIE, R. M.; SUTHERLAND, D. E. R.; SIMMONS, R. L.; NAJARIAN, J. S.:

The effect of serum ALG concentrations on results following renal transplantation.
Ann. Surg. 186, 619, 1977

(76) HOWARD, R. J.; CONDIE, R. M.; SUTHERLAND, D. E. R.; SIMMONS, R. L.; NAJARIAN, J. S.:

The use of antilymphoblast globulin in the treatment of renal allograft rejection.
Transplant. Proc. 13, 473, 1981

(77) HOWARD, R. J.; DOUGHERTY, S. F.; MERGENHAGEN, S. E.:

Prolongation of skin homografts by rabbit anti-mouse lymphocyte serum in mice rendered tolerant to rabbit gammaglobulin.
J. Immunol. 101, 301, 1968

(78) INDERBITZIN, T.:

Histamine in allergic responses of the skin. In: Ford, H: Hospital symposium on mechanisms of hypersensitivity, S. 493.
Little, Brown & Co. Boston, 1959

(79) INGBAR, S. H.; WOEBER, K. A.:

Diseases of the thyroid.
In: Thorn G. W., Adams R. G., Braunwald E., Isselbacher K., Petersdorf R. G.: Harrison's principles of internal medicine,
Vol. 1, 8th ed., S. 518
Mc Graw-Hill Book Company, N. Y., 1977

(80) JAMES, K.:

Antilymphocytic antibodies: A review.
Clin. exp. Immunol. 2, 615, 1967

(81) JAMES, K.:

The preparations and property of antilymphocyte sera.
Prog. Surg. 7, 140, 1969

(82) JARCK, H. U.; BLOCK, T.; HAMMER, C.; BERNHEIM, C.:

Immunosuppressive and nephrotoxic effect of Cyclosporin A and ALG in renal allotransplantation.
Surg. Forum 5, 35, 1983

(83) JEEJEEBHOY, H. F.:

Immunological studies on the rat thymectomized in adult life.
Immunology 9, 417, 1965

(84) JEEJEEBHOY, H. F.:

Inactivation of thymus and marrow-derived lymphocytes by heterologous antilymphocyte serum (ALS).
Transplant. Proc. 3, 793, 1971

(85) KANEDA, I.; MIURA, K.; SASAKI, T.; JIMBO, M.; SATOMI, S.; OKAZAKI, H.; TAGUCHI, Y.; KASAI, M.:

Macrophage as a suppressor cell or a helper cell in human renal transplant patients.
Transplant. Proc. 8, 678, 1981

(86) KELLY, G. E.; MEARS, D. C.; SHEIL, A. G. R.:

Relationship of the immunosuppressive potency of antilymphocyte globulin to three in vitro tests.
Transplantation 12, 443, 1971

(87) KNIGHT, S.; LING, N. R.:

Lymphocyte transforming activity of homologous and heterologous antisera to rabbit leukocytes.
Immunology 12, 537, 1967

(88) KOUNTZ, S.:

Radionuclides and renal transplantation.
In: Blaufox M. D.: Progress in nuclear medicine, Vol. II, S. 236.
Karger, Basel and University Park Press, Baltimore, 1972

(89) KOUNTZ, S. L.; BUTT, K. H. M.; RAO, T. K. S.; ZIELINSKI, C. M.; RAFI, M.; SCHULTZ, J. R.:

Antilymphocyte globulin (ALG) dosage and graft survival in renal transplantation.
Transplant. Proc. 9, 1023, 1977

(90) KRUISBEEK, A. M.; HEES v., E.:

The effect of macrophages on TdR incorporation into mitogen stimulated rat lymphocytes. In: Lucas, D. O. (ed.):Proceedings of the 11th international leukocyte culture conference: Regulatory mechanisms in lymphocyte activation, S. 788.
Academic Press, N. Y., 1977

(91) LANCE, E. M.:

The mechanism of action of antilymphocyte serum: Studies of antibody eluate.
J. exp. Med. 130, 49, 1969

(92) LANCE, E. M.:

The selective action of antilymphocyte serum on recirculating lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 6, 789, 1970

(93) LANCE, E. M.:

Antilymphocyte serum: Mechanisms of action.
Transplant. Proc. 4, 473, 1972

(94) LANCE, E. M.; DRESSER, D. W.:

Antigenicyty in mice of antilymphocyte gamma-globulin.
Nature (Lond.) 215, 488, 1967

(95) LANCE, E. M.; MEDAWAR, P. B.; TAUB, R. N.:

Antilymphocyte serum.
Adv. Immunol. 17, 1, 1973

(96) LAWRENCE, H. S.:

Mediators of cellular immunity.
Transplant. Proc. 5, 49, 1973

(97) LEVEY, R. H.; MEDAWAR, P. B.:

Nature and mode of action of antilymphocyte antiserum.
Proc. Nat. Acad. Sci. Lond. 56, 1130, 1967

(98) LEVEY, R. H.; MEDAWAR, P. B.:

Further studies on the action of anti-lymphocytic antiserum.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 470, 1967

(99) LEYTON, B.; EBSTEIN, F. H.:

Tumors of the urinary tract.
In: Thorn, G. W.; Adams, R. G.; Braunwald, E., Isselbacher, K. J.; Petersdorf, R. G.:
Harrison's principles of internal medicine, Vol. 2 8th ed., S. 1475
Mc Graw-Hill Book Company, N. Y., 1977

(100) LICH-GREGOIR, W.:
L'anastomose uretero-vesical laterale.
Acta Urol. Belg. 25, 4, 1957

(101) LIGHT, J. A.; ALIJANI, M. R.; BRIGGERS, J. A.; ODDENINO, K.; REINMUTH, B.:
Antilymphocyte globulin (ALG) reverses "irreversible" allograft rejection.
Transplant. Proc. 13, 475, 1981

(102) LINDQUIST, R. R.; GUTTMAN, R. D.; MERRILL, J. P.:

Renal transplantation in the inbred rat: VI. Elelectronmicroscopic study of mononuclear cells.
Transplantation 12, 1, 1971

(103) Lissner, J.:

Radiologie II, S. 232
F. Enke-Verlag Stuttgart, 1979

(104) McALACK, R. F.; STERN, S.; BEIZER, R.; SKLAR, L.; BANNET, A.:

Immunologic monitoring parameters in ALG-versus non ALG-treated renal transplant patients.
Transplant. Proc. 2, 1431, 1979

(105) McDONALD, G. A.; DODDS, T. C.; CRUICKSHANK, B.:

Atlas der Hämatologie, 3. Auflage.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1979

(106) MEDAWAR, P. B.:

Biological effects of heterologous antilymphocytic antisera.
In: Rappaport, F.; Dausset, J.: Human transplantation, S. 501.
Grune & Stratton, N. Y., 1968

(107) MERCK, E.:

Klinisches Labor der medizinisch-chemischen Untersuchungsmethoden, 11. Auflage.
E. Merck, Darmstadt, 1970

(108) METCHNIKOFF, E.:

Etudes sur la resoption des cellules.
Ann. Inst. Past. 13, 47, 1899

(109) MILLER, J. F. A. P.; OSOBA, D.:

Current concepts of the immunological function of the thymus.
Physiol. Rev. 47, 437, 1967

(110) MONACO, A. P.:

Antilymphocyte globulin.
In: Najarian, J. S.; Simmons, R. S.: Transplantation, S. 222.
Lea & Felbiger Philadelphia, 1976

(111) MONACO, A. P.; CAMPION, J. P.; KAPNICK, S. J.:

Clinical use of antilymphocyte globulin.
Transplant. Proc. 9, 1007, 1977

(112) MONACO, A. P.; CODISH, S. D.:

Survey of the current status of the clinical use of antilymphocyte serum.
Surg. Gynecol. Obstet. 142, 417, 1976

(113) MONACO, A. P.; WOOD, M. L.; GRAY, J. G.; RUSSEL, P. S.:

Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice.
J. Immunol. 96, 229, 1966

(114) NABARRA, B.; DESCAMPS, B.; HAMBURGER, J.:

Cell infiltration in human renal allografts: An ultrastructural study.
Transplant. Proc. 7 (Suppl.1) 645, 1975

(115) NAGAYA, H.; SIEKER, H. O.:

Feedback mechanisms of thymic lymphocyte production.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) 127, 131, 1967

(116) NAJARIAN, J. S.; SIMMONS, R. L.; CONDIE, R. M.; THOMPSON, A. J.; FRYD, D. S.; HOWARD, R. J.; MATAS, A. J.; SUTHERLAND, D. E. R.; FERGUSSON, R. M., SCHMIDTKE, J. R.:

Seven years' experience with antilymphoblast globulin for renal transplantation from cadaver donors.
Ann. Surg. 184, 352, 1976

(117) NAJARIAN, J. S.; SIMMONS, R. L.; GEWURZ, H.; MOBERG, A.; MERKEL, F.; MOORE, G. E.:

Antiserum to cultured human lymphoblasts: Preparation, purification and immunosuppressive properties in man.
Ann. Surg. 170, 617, 1969

(118) PAPPENHEIMER, A. M.:

Experimental studies upon lymphocytes: II. The action of immune sera upon lymphocytes and small thymus cells.
J. exp. Med. 26, 163, 1917

(119) PARROT, D. M. V.:

The response of draining lymphnodes to immunological stimulation in intact and thymectomized animals.
Symposium: Tissue and organtransplantation.
J. Clin. Path. (Suppl.) 20, 456, 1967

(120) PASTERNACK, A.:

Fine needle aspiration biopsy of human renal allografts.
Lancet 2, 82, 1968

(121) PASTERNACK, A.; VIROLAINEN, M.; HÄYRY, P.:

Fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of human renal allograft rejection.
J. Urol. 109, 167, 1973

(122) PATTERSON, J. T.; PISANO, J. C.; DILUZIO, N. R.:

Reversal of antilymphocyte serum-induced immunosuppression by macrophage administration.
Soc. exp. Biol. Med. 135, 831, 1970

(123) PICHLMAYR, R.:

Herstellung und Wirkung heterologer Antihundelymphozytenseren.
Z. ges. exp. Med. 143, 161, 1967

(124) PICHLMAYR, R.; BRENDEL, W.; MIKAELOFF, PH.; WIEBECKE, B.; RASSAT, J. P.; PICHLMAIER, J.; BOMEL, J.; FATEH-MOGHADAM, A.; THIERFELDER, ST.; MESSMER, K.; DESCOTTES, J.; KNEDEL, M.:

Survival of renal and liver homografts in dogs treated with heterologous antilymphocyte serum.
In: Dausset, J.; Hamburger,J.; Mathe, G.: Advance in transplantation, S. 147.
Munksgaard, Copenhagen, 1968

(125) PICHLMAYR, R.; BRENDEL, W.; ZENKER, R.:

Production and effect of heterologous anticanine lymphocyte serum.
Surgery 61, 774, 1967

(126) PIELSTICKER, K.:

Habilitationsarbeit 1973.

(127) RANKI, A.; HÄYRY, P.:

Histochemical distinction between lymphocytic and moncytic acid- -naphtyl acetate esterases (ANAE).
J. clin. Lab. Immunol. 1, 333, 1979

(128) REVILLARD, J. P.; BROCHIER, J.:

Selective deficiency of cell-mediated immunity in humans treated with antlymphocyte globulins.
Transplant. Proc. 3, 725, 1971

(129) REVILLARD, J. P.; BROCHIER, J.; TRAEGER, J.; BALNER, H.:

In vitro assay of suppressive properties of antilymphcyte sera on lymmphocyte stimulation.
Transplantation 9, 592, 1970

(130) RINGDEN, O.; QUADRACCI, L. J.; GROTH, C. G.:

The effects of anti-lymphocyte globulin on lymphocyte subpopulations in recipients of kidney allografts.
Scand. J. Urol. Nephrol. (Suppl.) 42, 86, 1977

(131) ROBERTS, P. J.; HÄYRY, P.:

Sponge matrix allografts.
Transplantation 21, 437, 1976

(132) ROWINSKI, W.; RYFFA, T.; RUKE, M.; WASOWKA, B.; TILNEY, N. L.; OLSZEWSKI, W. L.:

Platelet-induced donor-specific unresponsiveness to kidney allografts in mongrel dogs treated with ALG.
Transplant. Proc. 13, 586, 1981

(133) RUSSE, H. P.; CROWLE, A. J.:

A comparison of thymectomized and anti-thymocyte serum treated mice in their development of hypersensitivity to protein antigens.
J. Immunol. 94, 74, 1965

(134) SAKSELA, E.; TIMONEN, T.; RANKI, A.; HÄYRY, P.:

Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer cell activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets: A review.
Immunol. Rev. 44, 71, 1979

(135) SCHWARTZ, S. I.; KAPLAN, E. L.:

Thyroid and parathyroid.
In: Schwartz S. J.: Principles of surgery, 3rd ed., S. 1566, 1599
Mc Graw-Hill Book Company, N. Y., 1979

(136) SELL, S.:

Antilymphocytic antibody: Effects in experimental animals and problems in human use.
Ann. Int. Med. 71, 177, 1969

(137) SHEIL, A. G. R.; MAY, J.; ROGERS, J. H.; STOREY, B. G.; KATRAN, D. C.; DUGGIN, G. G.; JOHNSON, J. R.; STEWART, J. H.:

Causes of allograft failure in recipients treated with and without antilymphocyte globulin.
Transplant. Proc. 5, 561, 1973

(138) SHEIL, A. G. R.; MEARS, D.; JOHNSON, J. R.; KELLY, G. E.; MAY, J.; IBELS, L. S.; STEWART, J. H.:

Antilymphocyte globulin in patients with renal allografts from cadaveric donors.
Lancet 2, 227 , 1973

(139) SHEIL, A. G. R.; MEARS, D.; KELLY, G. E.; STEWART, J. H.; JOHNSON, J. R.; TILLER, D.; GALLERY, E. D. M.; DUGGIN, G. G.:

A controlled trial of antilymphocyte globulin therapy (ALG) in man.
Transplant. Proc. 4, 501, 1972

(140) SHEIL, A. G. R.; KELLY, G. E.; STOREY, B. G.; MAY, J.; KALOWSKI, S.; MEARS, D.; ROGERS, J. H.; JOHNSON, J. R.; CHARLESWORTH, J.; STEWART, J. H.:

Controlled clinical trial of antilymphocyte globulin in patients with renal allografts from cadaver donors.
Lancet 1, 359, 1971

(141) SPIGOS, D.; CAPEK, V.; JONASSON, O.:

Percutaneous biopsy of renal transplants using ultrasonographic guidance.
J. Urol. 117, 699, 1977

(142) STANGE, K.; HENNING, H. J.:

Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik, 2. Auflage.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1966

(143) STARZL, T. E.; MARCHIORO, T. L.; PORTER, K. A.; IWASAKI, Y.; CERILLI, G. J.:

The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation.
Surg. Gynecol. Obstet. 124, 301, 1967

(144) STROM, T. B.; TILNEY, N. L.; PARADYSZ, J. M.; BANCEWICZ, J.; CARPENTER, C. B.:

Cellular components of allografts rejection: Identity, specifity, and cytotoxid function of cells infiltrating acutely rejecting allografts.
J. Immunol. 118, 2020, 1977

(145) SUTHERLAND, D. E. R.; LUM, C. T.; PAYNE, W. D.; NAJARIAN, J. S.:

Effect of pretreatment with donor blood on renal allograft survival in dogs stratified by DLA match and MLC reactivity.
Transplant. Proc. 9, 160, 1979

(146) TAUB, R. N.:

Prolongation of skin homografts in mice using homologous antilymphocytic antisera.
In: Proceedings of the second international congress of the transplantation society.
Transplant. Proc., Vol. 1, part II, 1969

(147) TAYLOR, H. E.; ACKMAN, C. F. D.; HOROWITZ, I.:

Canadian clinical trial of antilymphocyte globulin in human cadaver renal transplantation.
Can. Med. Assoc. 115, 1205, 1976

(148) TILNEY, N. L.; GAROVOY, M. R.; BUSCH, G. J.; STROM, T. B.; GRAVES, M. J.; CARPENTER, C. B.:

Rejected human renal allografts.
Transplantation 28, 421, 1979

(149) TILNEY, N. L.; NOTIS-McCONARTY, J.; STROM, T. B.:

Specificity of cellular migration into cardiac allografts in rats.
Transplantation 26, 181, 1978

(150) TILNEY, N. L.; STROM, T. B.; MACPHERSON, S. G.; CARPENTER, C. B.:

Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats.
Transplantation 20, 323, 1975

(151) TILNEY, N. L.; STROM, T. B.; MACPHERSON, S. G.; CARPENTER, C. B.:

Studies on infiltrating host cells harvested from acutely rejecting rat cardiac allografts.
Surgery 79, 209, 1976

(152) TOURAINE, J. L.; MALIK, M. C.; TRAEGER, J.:

Antilymphocyte globulin and thoracic duct drainage in renal transplantation.
In: Salaman, J. R.: Immunosuppression, S. 60.
MTP Press limited, Lancaster, 1981

(153) TRAEGER, J.; TOURAINE, J. L.; FRIES, D.; BERTHOUX, F.:

Evaluation of intravenous route for administration of antilymphocyte globulin in humans.
Transplant. Proc. 3, 749, 1971

(154) TURK, J. L.; WILLOUGHBY, D. A.:

Central and peripheral effects of antilymphocyte sera.
Lancet 1, 249, 1967

(155) UNDRITZ, E.:

Atlas of hematology, 2nd ed.
Sandoz Ltd. Basle, 1973

(156) VRIESENDORP, H. M.; ALBERT, E. D.; TEMPLETON, J. W.; BELOTSKY, S.; TAYLOR, B.; BLUMENSTOCK, D. A.; BULL, R. W.; CANNON, F. D.; et al.:

Joint report of the second international workshop of canine immunogenetics.
Transplant. Proc. 8, 289, 1976

(157) WALKSMAN, B. H.; ARBOUYS, S.:

The use of specific "lymphocyte" antisera to inhibit hypersensitive reactions of the delayed type.
In: Mechanisms of antibody formation, S. 165.
Czeck Academy of Sciences, 1960

(158) WEMBACHER, J.; SENFTLEBER, I.; GÖKEL, M.; HAMMER, C.; BRENDEL, W.:

Assessment of lymphatic cells in natural and artificial allografts.
Surg. Forum 23, 115, 1980

(159) WILLEBRAND v., E.:

Fine-needle aspiration cytology of human renal transplants.
Clin. Immunol. Immunopath. 17, 309, 1980

(160) WILLEBRAND v., E.; HÄYRY, P.:

Composition and in vitro cytotoxicity of cellular infiltrates in rejecting human kidney allografts.
Cell. Immunol. 41, 358, 1978

(161) WILLEBRAND v., E.; SOOTS, A.; HÄYRY, P.:

In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection: I. Characterization of host cellular infiltrate in rejecting allograft parenchyma.
Cell. Immunol. 46, 309, 1979

(162) WILLEBRAND v., E.; SOOTS, A.; HÄYRY, P.:

In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection: II: Heterogeneity of effector cells in the inflammatory infiltrate vs that in the spleen of the recipient rat.
Cell. Immunol. 46, 327, 1979

(163) WINEARLS, C. G.; FABRE, J. W.; MILLARD, P. R.; MOORIS, P. J.:

The combined use of antilymphocyte serum and cyclophosphamide to suppress renal allograft rejection in the rat.
Clin. Exp. Immunol. 35, 242, 1979

(164) WOOD, M. L.; VRIESENDORP, H. M.:

A comparative study of heterologous anti-mouse lymphocyte and antimouse thymocyte sera prepared by two different immunization methods.
Transplantation 7, 522, 1969

(165) WOODRUFF, M. F. A.:

Immunological properties of antilymphocytic serum.
J. Clin. Path. 20 (Suppl.), 466, 1967

(166) WOODRUFF, M. F. A.:

Antilymphocytic serum and its mode of action.
Transplant. Proc. 3, 34, 1971

(167) WOODRUFF, M. F. A.; ANDERSON, N. F.:

The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocyte serum on the survival of skin homografts in rats.
Ann. Acad. Sci. N. Y. 120, 119, 1964

(168) WOODRUFF, M. F. A.; REID, B.; JAMES, K.:

Effect of antilymphocytic antibody and antibody fragments on human lymphocytes in vitro.
Nature (Lond.) 215, 591, 1967

(169) WOODRUFF, M. F. A.; REID, B.; JAMES, K.:

Quantitative studies with antilymphocyte antibodies.
Nature 216, 758, 1967

(170) WORTIS, N. H:; COOPER, A. G.; BROWN, M. C.:

Inhibition of human lymphocyte rosetting by anti T-Sera.
Nature (New. Biol.) 243, 109, 1973

(171) ZIMMERMANN, B.; TSUI, F.:

Immunosuppressive antilymphocyte serum:
III. Different subpopulations of T-lymphocytes are influenced at different doses of antilymphocyte serum.
Transplantation 28, 323, 1979

(172) ZINCKE, H.; WOODS, J. E.:

Attempted immunological alteration of canine renal allograft donors.
Transplantation 18, 480, 1974

(173) ZOLLINGER, H. U.; MIHATSCH, M. J.:

Renal pathology in biopsy, S. 4, 565.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1978

9. ANHANG:

Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. W. Brendel danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Chirurgische Forschung und für seine ständigen Anregungen und Ratschläge im Verlauf der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Einführung in die immunologischen und chirurgischen Grundlagen der Transplantation und für die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Herrn Professor Dr. med. M. Gokel danke ich für die Untersuchung und Beurteilung der histologischen Präparate.

Für die technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft danke ich insbesondere Fräulein G. Höbel, Fräulein Csapo sowie Herrn Frisch und seinen Helfern.

Lebenslauf:

Am 25. November 1955 wurde ich als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Manfred Block und der Zahnärztin Dr. Edelgard Block geborene Bartsch in Berlin geboren.

1962 - 1966	Carl-Orff-Grundschule Berlin
1966 - 1974	Luisenstiftung-Gymnasium Berlin, Abitur am 11. Dezember 1974
Dezember 1974 - Juni 1976	Krankenpflegepraktikum und Krankenpflegerhelfertätigkeit im Krankenhaus "Am Urban" in Berlin (Urologie, Orthopädie)
Juli 1976 - Juni 1977	Mitarbeit in der elterlichen Rechtsanwalts- und Notarpraxis
Juni 1977	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
März 1979	Ärztliche Vorprüfung
März 1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1980	Beginn der Promotions- und Mitarbeit am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Herr Professor Dr. Dr. W. Brendel) unter Leitung des Herrn Professor Dr. Dr. C. Hammer
September 1981 - November 1981	Auf Einladung des Herrn Professor Dr. Beltzer Besuch des Departments of Surgery and Transplantation, University Hospitals of Wisconsin, USA
August 1982	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Oktober 1982 - Oktober 1983	Praktisches Jahr im Klinikum Großhadern der Universität München (Chirurgische Klinik, Urologische Klinik, Medizinische Klinik II)
25. Oktober 1983	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
27. Oktober 1983	Approbation als Arzt

Seit 28. Oktober 1983 verheiratet mit Frau Valentine geborene Krauß.

Am 1. Januar 1984 begann ich an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung für Abdominal- und Transplantationschirurgie, Leiter: Herr Professor Dr. med. R. Pichlmayr, meine chirurgische Facharztausbildung.

Offsetdruck Böttger
Dissertationen & Reprints
Salzweg 18
3 Hannover-Badenstedt (81)
Tel. (0511) 49 22 22